

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي _ جيجل
République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد الصديق بن يحيى - جيجل
Université Mohammed Seddik Benyahia – Jijel –

Faculté des Sciences de la Nature et
de la Vie
Département de Biologie Moléculaire et
Cellulaire



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme : Master Académique en Biologie

Option : Sciences Pharmacologiques

Thème

*Effet antioxydant et génoprotecteur des extraits aqueux et
éthanolique des feuilles de Pistacia lentiscus L. de la région de Jijel
contre la toxicité du cyclophosphamide chez la souris*

Devant le Jury:

Présidente : Dr MEDJAHED Z.

Examinatrice : Mme AZZOUZ W.

Encadrante : Dr BENGUEDOUAR L.

Présenté par:

Yasmina BOUCEKKINE

Sara BOUCHABOU

Année Universitaire : 2020/2021

Numéro d'ordre :.....

Remerciements

*Louanges à **ALLAH** le clément, le tout puissant qui nous a procuré la patience, la force le courage d'aller au bout de notre objectif.*

*Nous tenons particulièrement et chaleureusement à remercier notre promotrice **Mme BENGUEDOUER. L.** Pour sa confiance, ses encouragements et conseils tout au long de la réalisation de ce travail. Pour son soutien, patience, disponibilité, gentillesse et sa grande générosité, qu'elle soit assurée de notre profonde gratitude. Ce travail n'aurait pas été le même sans votre encadrement.*

Qu'il nous soit permis de remercier également :

Mme MEDJAHED .Z, de nous avoir fait l'honneur de

Présider le jury ;

Mme AZZOUZ d'avoir acceptés d'examiner

Notre mémoire ;

On a eu le plaisir d'effectuer notre

Recherche dans le Laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie,

de l'université MOHAMMED SEDDIK BEN YAHIA–Jijel,

Qu'elle trouve ici toute notre sympathie.

On remercie l'ensemble du personnel du laboratoire

Pour leur convivialité, pour leur disponibilité.

Enfin, nos gratitude sont adressés spécialement à

nos familles, amis (es) et toutes personnes ont pus

Soutenir de près ou de loin la préparation de ce

modeste travail.

Dédicace



*Au nom **d'ALLAH**, le tout Miséricordieux le très Miséricordieux*

Je remercie Allah Le tout puissant, clément et Miséricordieux de m'avoir motivé à réaliser ce modeste travail,

en suite je remercie infiniment mes parents qui m'ont encouragé et aidé à arriver à ce stade de formation.

*Je dédie ce modeste travail à ma mère **Fatima**, qui a sacrifié sa vie afin de réussir dans le parcours de l'enseignement, celle qui est restée toujours à mes côtés dans les moments rudes de ma vie.*

*Je dédie ce modeste travail à mon père **Ammar**, qui m'a accompagné durant les moments les plus pénibles de ce long parcours de mon éducation.*

*A mes frères **Haroun, AbdRaeuf, Aissa , Daoud et Hicham***

*A ma sœur **warda**.*

*A mon fiancé **Ammar** qui a su m'encourager toujours à aller plus loin: je tenais à vous remercier pour vos conseils et vos encouragements aux moments les plus délicats.*

*Un Merci spéciale pour **Dr Chuoikhe N***

A tous mes amis

*A mon binôme **Sara** et également à toute la promotion **Master II pharmacologique, 2021.***

A tous ceux qui ont, contribué de loin ou de près à la réalisation de ce mémoire.

YASMINA

Dédicace



*Au nom **d'ALLAH**, le tout Miséricordieux le très Miséricordieux*

Je remercie Allah Le tout puissant, clément et Miséricordieux de m'avoir motivé à réaliser ce modeste travail,

Je remercie infiniment mes parents qui m'ont encouragé et aidé à arriver à ce stade de formation.

Je dédie ce modeste travail à ma mère, qui a sacrifié sa vie afin de réussir dans le parcours universitaires, celle qui est restée toujours à mes côtés dans les moments rudes de ma vie.

Je dédie ce modeste travail à mon père, qui m'a accompagné durant les moments les plus pénibles de ce long parcours de mon éducation.

A tous ceux qui ont, contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

SABA

Liste des abréviations

MN	Micronoyaux
CA	Aberration Chromosomique
ECS	Echange entre chromatides sœurs
CPA	Cyclophosphamide
SOD	Superoxydedismutase
CAT	Catalase
GSH	Glutathion réduit
ERO	Espèces réactif d'oxygène
GST	Glutathion-s-transférase
MRP2	Multidrugresistance-associatedprotein 2
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
OHCP	Hydroxy cyclophosphamide
PPL	<i>Pistacia Lentiscus L</i>
MGG	May GrünwaldGiemsa
ETC	Electron Transport Chain

Liste des figures

Fig.1	Lésions primaires de l'ADN.....	6
Fig.2	Types de mutations géniques	7
Fig.3	Différentes mutations chromosomiques	8
Fig.4	Principe du test des comètes.....	10
Fig.5	Formation des micronoyaux.....	12
Fig.6	Micronoyaux sous microscope.....	13
Fig.7	Principe de test de Ames	15
Fig.8	Structure chimique du cyclophosphamide	17
Fig.9	Voie métabolique majeure du cyclophosphamide	19
Fig.10	Formation d'ions aziridinium à partir de la moutarde azotée et son activité d'alkylation de l'ADN.....	19
Fig.11	Défenses antioxydantes cellulaires impliquant les enzymes, la SOD et la CAT.....	21
Fig.12	Photographies de PLL	25
Fig.13	Aire de répartition du genre.....	26
Fig.14	Distribution de PLL dans le bassin méditerranéen.....	27
Fig.15	Pourcentage de réduction de H ₂ O ₂	43
Fig.16	Pouvoir de piégeage des radicaux hydroxyles (OH°)	45
Fig.17	Variations de l'activité enzymatique de la superoxydedismutaseMitochondriales.....	46
Fig.18	Déférentes variations de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)	47
Fig.19	Variation de pourcentage des micronoyaux des érythrocytes.....	48
Fig.20	Photographie montrent certains exemplaires des frottis réalisés pour le test de micronoyaux des souris.....	49

Liste de tableaux

Tableau 1. Classification taxonomique de <i>Pistacia lentiscus.L</i>	25
Tableau 2. Rendement d'extraction par rapport au solvant d'extraction.....	41
Tableau 3. Teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins des deux extraits de PLL.....	42

Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux
Introduction 1

Partie I : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Génotoxicité

I.1. Généralité..... 3
I.2. Agents génotoxiques..... 3
I.2.1. Agents chimique 4
I.2.1.1. Analogues d'acide nucléique..... 4
I.2.1.2. Les agents intercalaires..... 4
I.2.1.3. Modificateurs de bases..... 4
I.2.2. Agents physique 5
I.2.3. Agents biologique..... 5
I.3. Types des dommages de l'ADN induits par les substances génotoxiques 5
I.3.1. Lésions primaires..... 5
I.3.2. Mutations 6
I.3.2.1. Mutations géniques..... 6
I.3.2.2. Mutations chromosomiques..... 7
I.3.2.3. Mutation génomiques 8
I.4. Teste de génotoxicité 8
I.4.1. Test des comètes..... 9
I.4.1.1. Applications du test des comètes 11
I.4.1.2. Avantages du test des comètes..... 11
I.4.1.3. Limites du test des comètes 11
I.4.2. Teste de micronoyaux..... 12
I.4.2.1. Applications du Teste de micronoyaux 13
I.4.2.2. Avantages du Teste de micronoyaux 13
I.4.2.3. Limites du Teste de micronoyaux 14
I.4.3. Teste de Ames 14
I.4.4. Teste d'Abberation Chromosomique (AC) 15

I.4.5. Echange Entre Chromatides Seoures (ECS).....	15
---	----

Chapitre II : Génotoxicité de cyclophosphamide

II.1. Généralité	16
II.2. Cyclophosphamide	16
II.2.1. Définition	16
II.2.2. Pharmacocinétique du cyclophosphamide	17
II.2.2.1. Absorption	17
II.2.2.2. Distribution	17
II.2.2.3. Métabolisme et mode d'action	17
II.2.2.4. Transport	20
II.2.2.5. Excrétion	20
II.3. Effets indésirables du cyclophosphamide	20
II.3.1. Cyclophosphamide et stress oxydatif.....	20
II.3.2. Génotoxicité du cyclophosphamide	22
II.2.4.3. Autres effets indésirables du cyclophosphamide	22
II.2.4.3.1. Cardiotoxicité	22
II.2.4.3.2 Hépatotoxicité	23

Chapitre III : *Pistacia lentiscus.L*

III.1. Généralités.....	24
III.2. Etude botanique et Taxonomique de <i>Pistacia. L</i>	24
III.2.1. Description botanique	24
III.2.2. Place dans la systématique.....	25
III.2.3. Répartition géographique de <i>Pistacialentiscus</i>	26
III.3. Criblage phytochimique de la plante	27
III.4. Utilisations de <i>Pistacia lentiscus.L</i>	28
III.4.1. Utilisations traditionnelles.....	28
III.4.2. Utilisations biologiques.....	28
III.4.2.1. Activité antioxydante.....	28
III.4.2.2. Activité hépatoprotectrice	29
III.4.2.3. Activité anticancéreuse	29
III.4.2.4. Activité antiulcéreuse	30
III.4.2.5. Activité anti-inflammatoires	30
III.4.3. Utilisation industrielle.....	30

Partie II : Partie expérimentale**Chapitre IV : matériels et méthodes**

IV.1. Etude phytochimique de la plante	31
IV.1.1. Matériel végétal.....	31
IV.1.2. Extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes	31
IV.1.2.1. Préparation de l'extrait éthanolique	31
IV.1.2.2. Préparation de l'extrait aqueux	32
IV.1.3. Rendement d'extraction	32
IV.1.4. Le criblage phytochimique des extraits	32
IV.1.4.1. Dosage des polyphénols totaux	32
IV.1.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux	33
IV.1.4.3. Dosage des tanins condensés	33
IV.2. Evaluation du pouvoir antioxydant <i>in vitro</i> ...	33
IV.2.1. Pouvoir réducteur de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	33
IV.2.2. Test de piégeage des radicaux hydroxyles (OH [°])	34
IV.3. Etude de l'effet <i>in vitro</i> des extraits éthanolique et aqueux sur le stress oxydatif mitochondrial induit par le cyclophosphamide	35
IV.3.1. Isolement des mitochondries hépatiques	35
IV.3.2. Dosage des protéines (Bradford)	35
IV.3.3. Stimulation des mitochondries hépatiques <i>in vitro</i>	36
IV.3.4. Extraction de la matrice mitochondriale	36
IV.3.4.1. Mesure de l'activité enzymatique de la Superoxyde dismutase (SOD)	37
IV.3.4.2. Mesure de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT).....	37
IV.4. Etude <i>in vivo</i> de l'effet de l'extrait aqueux des feuilles de PLL contre la génotoxicité du cyclophosphamide.....	38
IV.4.1. Entretien des animaux	38
IV.4.2. Répartition et traitement des animaux	38
IV.4.3. Sacrifice des animaux et prélèvement du sang	39
IV.4.4. Test de micronoyaux	39
IV.4.4.1. Observation microscopique et Dénombrement des cellules... ..	39
IV.5. Etude statistique	39
IV.5.1. Testes du pouvoir antioxydante (OH [°] , H ₂ O ₂).....	39
IV.5.2. L'étude <i>in vitro</i> de l'activité enzymatique mitochondrial (SOD, CAT) et l'étude <i>in vivo</i> (le teste des micronoyaux).....	40

Partie III : Résultats et discussions

Chapitre V : Résultats et discussions	41
Conclusion et perspectives	54
Références Bibliographiques	55
Annexes	

Le cancer représente un problème majeur de santé publique. Il constitue la première cause de mortalité dans le monde entier. C'est une pathologie qui se développe à partir de cellules anormales qui se multiplient de manière incontrôlée. La mutation de certains gènes est à l'origine de leur apparition (Tigrine, 2018).

La prise en charge du cancer comprend un ou une combinaison de plusieurs traitements (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, immunothérapie ou traitement ciblé). En effet la chimiothérapie anticancéreuse occupe une place considérable dans le traitement des cancers. Elle est basée sur l'administration de médicaments dits « cytotoxiques » qui vont détruire les cellules tumorales. Ces médicaments peuvent agir sur différents processus impliqués dans la multiplication des cellules. Cependant, le traitement par ces médicaments anticancéreux notamment [le cyclophosphamide] qui est un agent alkylant provoque plusieurs effets indésirables envers les cellules normales à renouvellement rapide. De plus, ces médicaments se sont révélés mutagènes, cancérigènes et génotoxiques (Mc Carroll, 2008).

Le retour à la médecine traditionnelle, chez la plupart des scientifiques, s'est intensifié ces dernières années. Cette médecine populaire est basée sur l'utilisation des plantes dites médicinales, des légumes et des fruits comme sources de substances naturelles actives dans le traitement de la plupart des maladies. Plusieurs études ont montré que les plantes médicinales sont très riches en molécules à activité biologique comme les flavonoïdes. Ces composés polyphénoliques sont très répandus dans les aliments d'origine végétale et sont doués de plusieurs activités biologiques y compris les activités : antioxydante, anticancéreuse et chimio-préventive (Tigrine, 2018). Parmi les plantes médicinales riches en ces molécules prometteuses de grade thérapeutique on trouve *Pistacia Lentiscus L* (PLL). Cette plante est considérée comme un efficace remède pour le traitement des ulcères, l'hypertension, la toux, les maux de gorge, l'eczéma, les calculs rénaux et la jaunisse. Plusieurs travaux de recherche ont montré la richesse de *Pistacia Lentiscus. L* en molécules bioactives. Cette plante est une source de composés polyphénoliques, dont nous citons les flavonoïdes (Djedja, 2017).

La présente étude vise à étudier l'effet protecteur de l'extrait des feuilles de PLL de la région de Jijel (Texenna) contre le stress oxydatif *in vitro* et la génotoxicité induites par le cyclophosphamide *in vivo*.

Le travail est scindé en deux grandes parties :

□ La première consiste en une revue bibliographique dans laquelle sont détaillés les chapitres suivants:

▪Génotoxicité

- Génotoxicité du cyclophosphamide.
- Caractérisation botanique et chimique de *Pistacia lentiscus L.*
- La deuxième partie est une étude expérimentale, composée de trois volets:
 - Le premier, consiste en préparation des extraits secs (aqueux et éthanolique) des feuilles de PLL et dosages phytochimiques.
 - Le deuxième, est consacré a l'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des extraits de feuilles de PLL contre le stress oxydatif mitochondrial induit par le cyclophosphamide.
 - Le troisième, étudié l'effet génoprotecteur de l'extrait aqueux des feuilles de PLL *in vivo*, par la réalisation du test de micronoyaux.

I.1. Généralités

La molécule d'ADN est une macromolécule se présentant sous la forme de 2 chaînes complémentaires enroulées l'une autour de l'autre pour former une structure bicaténaire hélicoïdale. L'ADN est le support de l'information génétique de la plupart des êtres vivants ; il a longtemps été supposé que cette macromolécule devait être extraordinairement stable afin de maintenir le haut degré de fidélité lors de la transmission des caractères héréditaires. Il a été constaté que la structure primaire de la molécule d'ADN est une structure dynamique sujette à de constants changements (ex. transposition de gènes, altération de bases ou de nucléotides). Ces modifications peuvent être endogènes, liées à l'activité normale de la cellule ou exogènes, dues à des agents génotoxiques capables de générer une action toxique au sein du génome (Plumejeaud, 2016).

La toxicologie génétique ou génotoxicologie est une discipline qui vise à détecter des facteurs chimiques ou physiques interagissant (directement ou non) avec l'ADN des cellules somatiques et/ou germinales et qui, en absence de réparation fidèle, sont susceptibles de provoquer des mutations géniques et/ ou chromosomiques. Ces mutations géniques et chromosomiques sont susceptibles d'initier un processus cancérogène lorsqu'elles ont lieu sur des cellules somatiques. En cas d'atteinte des cellules germinales, l'effet génotoxique risque d'entraîner une toxicité vis-à-vis de la reproduction (reprotoxicité) et/ou un risque théorique de transmission des mutations à la descendance (Berthelot-Ricou et *al.*, 2013).

La génotoxicité correspond à toutes les modifications physiques ou fonctionnelles du génome. Il existe deux types de génotoxicité:

- La génotoxicité directe qui implique une interaction entre le contaminant et l'ADN soit *via* les sites nucléophiles soit directement en modifiant les liaisons existantes.
- La génotoxicité indirecte où le toxique affecte des composants cellulaires associés à l'ADN comme par exemple des enzymes liées à la réparation et la réplication de l'ADN (Pannetier, 2018).

I.2. Agents génotoxiques

Un agent est dit génotoxique lorsqu'il possède une toxicité directe ou indirecte *vis-à-vis* du génome. Il peut être considéré comme un agent mutagène lorsque par son action, fait augmenter significativement l'apparition de mutations (Plumejeaud, 2016).

peuvent être divisés en trois grandes classes, comprenant

I.2.1. Agents chimiques

Ce sont des mutagènes électrophiles qui établissent une liaison covalente avec un site nucléophile d'une base d'ADN. Parmi les sites nucléophiles, les azotes aromatiques, les groupements hydroxyles et carbonyles de bases constitutives d'ADN qui constituent les cibles privilégiées des agents chimiques génotoxiques (Benhacine et Sahil, 2016).

I.2.1.1. Analogues d'acide nucléique

Sont des substances présentes dans la nature, et qui ont une structure similaire à celle de l'acide nucléique (Jean *et al.*, 2000).

Des modifications des nucléosides naturels peuvent être apportées de plusieurs façons, soit par modification de la base hétérocyclique soit par modulation du sucre. Les modifications liées à la base sont limitées car l'activité biologique est directement liée à sa capacité à former des liaisons hydrogène. Les modifications du cycle furanose sont plus polyvalentes. En effet, il est possible d'éliminer des groupes hydroxyles (désoxynucléosides), de modifier leur configuration ou même d'introduire de nouveaux substituants, comme dans le cas de l'agent AZT anti-VIH. Il est également possible de remplacer le cycle furanose par un hétérocycle différent (AZA-nucléosides, thionucléosides et dioxolanyle, oxathiolanyle et nucléosides isoxazolidinyle), par un carbocycle (carba-nucléosides) ou par une chaîne acyclique. Ces modifications ont des effets importants sur la conformation des nucléosides (Alvarenga, 2016).

I.2.1.2. Les agents intercalaires

Ce sont des molécules provoquant une détorsion de la molécule d'ADN et donc un empêchement de la progression des ARN et ADN polymérases, ainsi qu'une inhibition de la réplication et de la transcription. La présence de substance intercalée entre les deux brins de l'ADN peut perturber l'action de l'ADN topoisomérases I et II et provoquer des cassures mono- et bicaténares. Il existe différents groupes utilisés en clinique : comme les Anthracyclines (doxorubicine) (Lenglet, 2010).

I.2.1.3. Modificateurs de bases

Tel que les agents alkylants, qui sont des composés fortement électrophiles qui vont réagir avec des molécules possédant des radicaux nucléophiles tels que les groupements -SH, -OH, -COOH ou -NH₂ que l'on retrouve dans les acides nucléiques et les protéines. L'interaction par liaison covalente entre l'agent alkylant et l'ADN produit différents types d'adduits (Lenglet, 2010).

I.2.2. Agents physiques

Ils comprennent les rayonnements électromagnétiques, tels que les rayons gamma, les rayons X et les rayonnements UV, ainsi que les rayonnements particulaires, tels que les neutrons rapides et thermiques.

Les différents mutagènes augmentent la fréquence des mutations qui peuvent être soumises à la sélection, mais aucun mutagène n'est spécifique à un type de mutation. Cependant, les radiations ionisantes produisent surtout des cassures chromosomiques, entraînant des délétions, inversions et des translocations (Amri-Tilouine, 2019).

I.2.3. Agents biologiques

Les agents biologiques sont des organismes "vivants" qui peuvent modifier les séquences du matériel génétique de leur hôte comme par exemple ; les virus et les bactéries. Ils sont plus puissants que la plupart des agents chimiques mortels; de petites quantités peuvent conduire à des effets dévastateurs (Rosenbloom et *al.*, 2002).

Les termes plus larges « génotoxicité » et « toxicité génétique », qui sont synonymes, incluent la mutagénicité, mais aussi l'ADN dommages, qui peuvent être inversés par des processus de réparation de l'ADN ou d'autres processus cellulaires connus ou entraîner la mort cellulaire et ne pas entraîner altérations permanentes de la structure ou du contenu informatif du cellule survivante ou sa descendance (Rosenbloom et *al.*, 2002).

I.3. Types des dommages de l'ADN induits par les substances génotoxiques

L'ADN est une structure fragile, soumise en permanence à des activités métaboliques et à des facteurs exogènes pouvant altérer sa structure et son intégrité (Kaltenbach, 2015). En effet, il apparaît que l'accessibilité des sites nucléophiles de l'ADN aux attaques des agents génotoxiques n'est pas la même.

Par ailleurs, il existe une très grande variété des degrés d'altération de l'ADN. Il est classique de distinguer les lésions primaires à l'ADN, les mutations géniques, chromosomiques (effets clastogènes) et génomiques (effets aneugènes) (Orsière et *al.*, 2005).

I.3.1. Lésions primaires

Les lésions primaires à l'ADN représentent le premier stade à la suite de l'action d'un agent génotoxique (Figure 1).

Ces lésions correspondent aux cassures de l'hélice simple brin ou double brin, aux mésappariements de nucléotides, aux ponts inter-brins ou encore aux modifications de base (Kaltenbach, 2015).

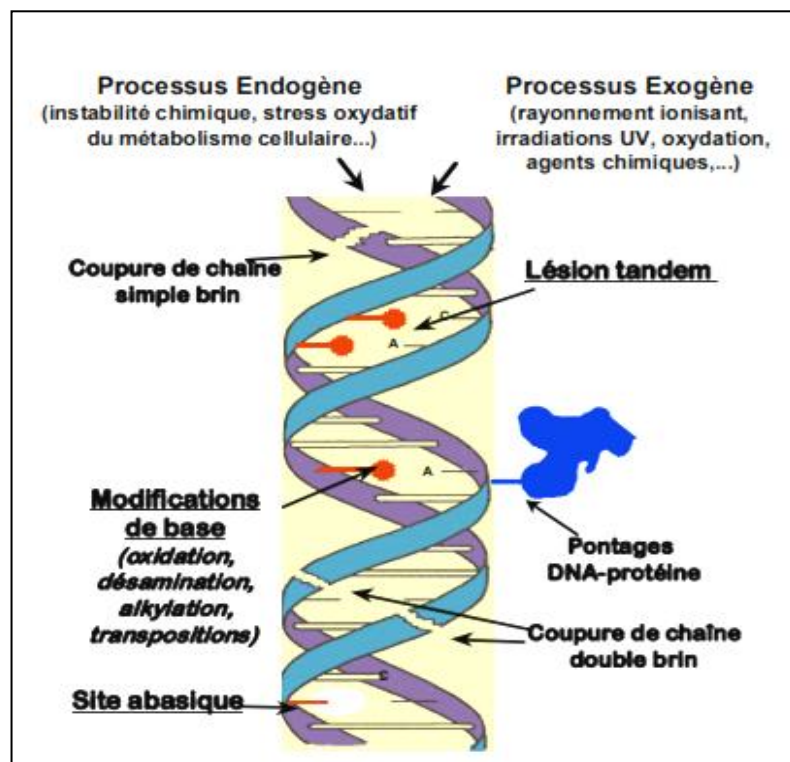


Figure 1 : Lésions primaires de l'ADN (Bellon, 2003)

I.3.2. Mutations

Les mutations sont des événements majeurs provoquant nécessairement l'apparition de nouveaux organismes. Les mutations consistent plutôt en des altérations plus ou moins importantes et spontanées c'est-à-dire, dues à des agents naturels inconnus du matériel héréditaire (des gènes) (Merlin, 2009).

Trois types de mutations sont observés selon leur localisation.

I.3.2.1. Mutations géniques

Les mutations géniques peuvent résulter de substitutions de paires de bases : transitions (substitution d'une base purique par une autre base purique ou substitution d'une base pyrimidine par une autre base pyrimidine) (Figure 2), ou transversions (inversion entre une base purique et pyrimidine) et de décalage du sens de lecture (frameshift). Les substitutions de paires de bases donneront lieu à des mutations ponctuelles. En revanche, le décalage du cadre de lecture, qui est dû à l'insertion ou la délétion d'une ou plusieurs paires nucléotidiques, aura pour effet possible de modifier un gène ou un groupe de gènes, pouvant ensuite modifier l'expression et la régulation de nombreux autres, mais surtout aboutir à des

protéines plus ou moins tronquées, non fonctionnelles. Ces mutations sont provoquées par des agents génotoxiques suite à des erreurs de réplication ou de réparation des dommages engendrés (Graillot, 2012).

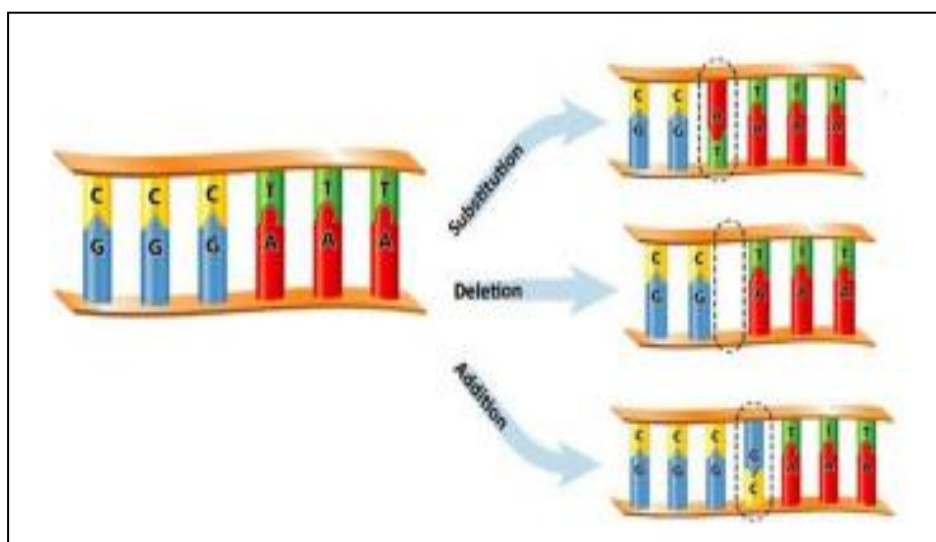


Figure 2 : Types de mutations géniques (Herilalaina Ravelomanantsoa, 2018)

I.3.2.2. Mutations chromosomiques

Les mutations chromosomiques sont provoquées par des agents dit clastogènes (cassure du chromosome). Ces agents altèrent la structure des chromosomes suite à des cassures de la double hélice d'ADN, entraînant des pertes de chromosomes (partielles ou entières), des aberrations structurales, et des translocations chromosomiques (Figure 3), qui auront pour effet d'affecter des dizaines, voire des centaines de gènes (Iarmarcovai et *al.*, 2007).

Étant donné que la régulation de l'activité d'un gène dépend en partie de sa localisation dans le génome. Les mutations chromosomiques ont en général des effets considérables, car elles éliminent une partie du gène, ou modifient le moment où un gène donné est activé ou désactivé. Parmi les composés clastogènes connus, on peut citer la mitomycine C (Whitwell et *al.*, 2010).

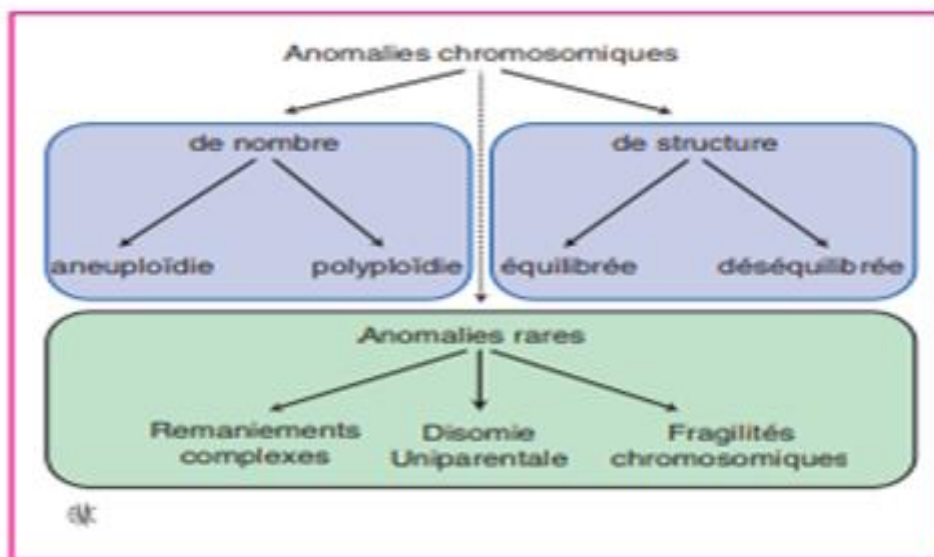


Figure 3 : Différentes mutations chromosomiques (Dimassi et *al.*, 2017).

I.3.2.3. Mutations génomiques

Les mutations génomiques sont provoquées par des agents dits aneugènes (changement du nombre de chromosomes) (Iarmarcovai et *al.*, 2007). Ces agents perturbent la ségrégation des chromosomes durant la méiose ou la mitose, provoquant une mauvaise distribution du matériel génétique dans les cellules filles. On parle alors d'aneuploïdie pour tout écart par rapport au nombre diploïde (ou haploïde) normal de chromosomes. Les mutations génomiques sont néfastes pour un organisme, car elles modifient l'équilibre des fonctions de milliers de gènes. On peut citer comme exemple le cas de la trisomie 21 : un gain de chromosome est observé dans la paire n°21. La colchicine, est un exemple d'agent aneugène (Whitwell et *al.*, 2010 ; Attia, 2011).

I.4. Tests de génotoxicité

Les tests de génotoxicité sont des biomarqueurs qui permettent de mettre en évidence des altérations au niveau de l'ADN suite à l'exposition à des agents mutagènes/cancérogènes génotoxiques (Eslava, 2004).

Les lésions primaires de l'ADN peuvent être évaluées par le test des comètes, ou par la détection de différents types d'adduits ; les mutations géniques par le test de Ames et le « Mouse lymphoma assay », les lésions chromosomiques clastogènes et aneugènes par le test des aberrations chromosomiques ou le test des micronoyaux (Ricou-Berthelot, 2014).

I.4.1. Test des comètes

L'idée originale de ce test revient à Rydberg et Johânsen en 1978. Ils furent les premiers à quantifier les dommages à l'ADN dans des cellules isolées de mammifères incluses dans de l'agarose sur lame de microscope. Après lyse de ces cellules en conditions alcalines, permettant le déroulement partiel de la chromatine, et marquage à l'acridine orange, la mesure du rapport fluorescence verte / fluorescence rouge, traduisant le rapport entre les molécules d'ADN double-brin et simple-brin, apportait une information sur l'intégrité du génome et la mesure du degré de dommages à l'ADN. Plus tard, Ôstling et Johânsen, (1984) apportent quelques modifications et donnent à l'essai son nom de test des comètes. Ils ajoutent au protocole une brève étape d'électrophorèse en conditions neutres et optèrent pour une coloration au bromure d'éthidium. Mais cette technique ne permettait que la détection des cassures double-brin (Lemiere, 2004).

Le test des comètes est une technique d'électrophorèse sur microgel qui détecte les dommages et la réparation de l'ADN dans des cellules individuelles. Les dommages sont représentés par une augmentation des fragments d'ADN, qui ont migré hors du noyau cellulaire sous la forme d'une traînée caractéristique semblable à la queue d'une comète. Les fragments d'ADN sont générés par des cassures d'ADN double brin, des cassures simple brin et/ou des cassures de brin induites par des sites labiles aux alcalis dans la version alcaline du test (Krishna et *al.*, 2019).

Le principe du test est que l'ADN nucléaire est séparé dans le champ électrique en fonction de la charge et de la taille des fragments (Figure 4), ce qui peut être visualisé à l'aide d'un colorant fluorescent pouvant se lier à l'ADN. Au cours du test des comètes, l'ADN intact reste dans la tête de la comète, tandis que de courts fragments de brins d'ADN migrent dans la queue. Les images obtenues au microscope ressemblent à une comète, composée d'une tête et d'une queue. La quantité de dommages à l'ADN est directement proportionnelle à l'étendue de l'ADN dans la queue de la comète. En outre, le test des comètes mesure également le diamètre de la tête de la comète, le moment de la queue d'Olive et la longueur de la queue de la comète, etc., car ces paramètres sont également associés aux dommages à l'ADN. Le test des comètes est utilisé pour évaluer les dommages à l'ADN dans un certain nombre de types de cellules, y compris les spermatozoïdes, et dans un large éventail d'études (Simon et Carrell, 2018).

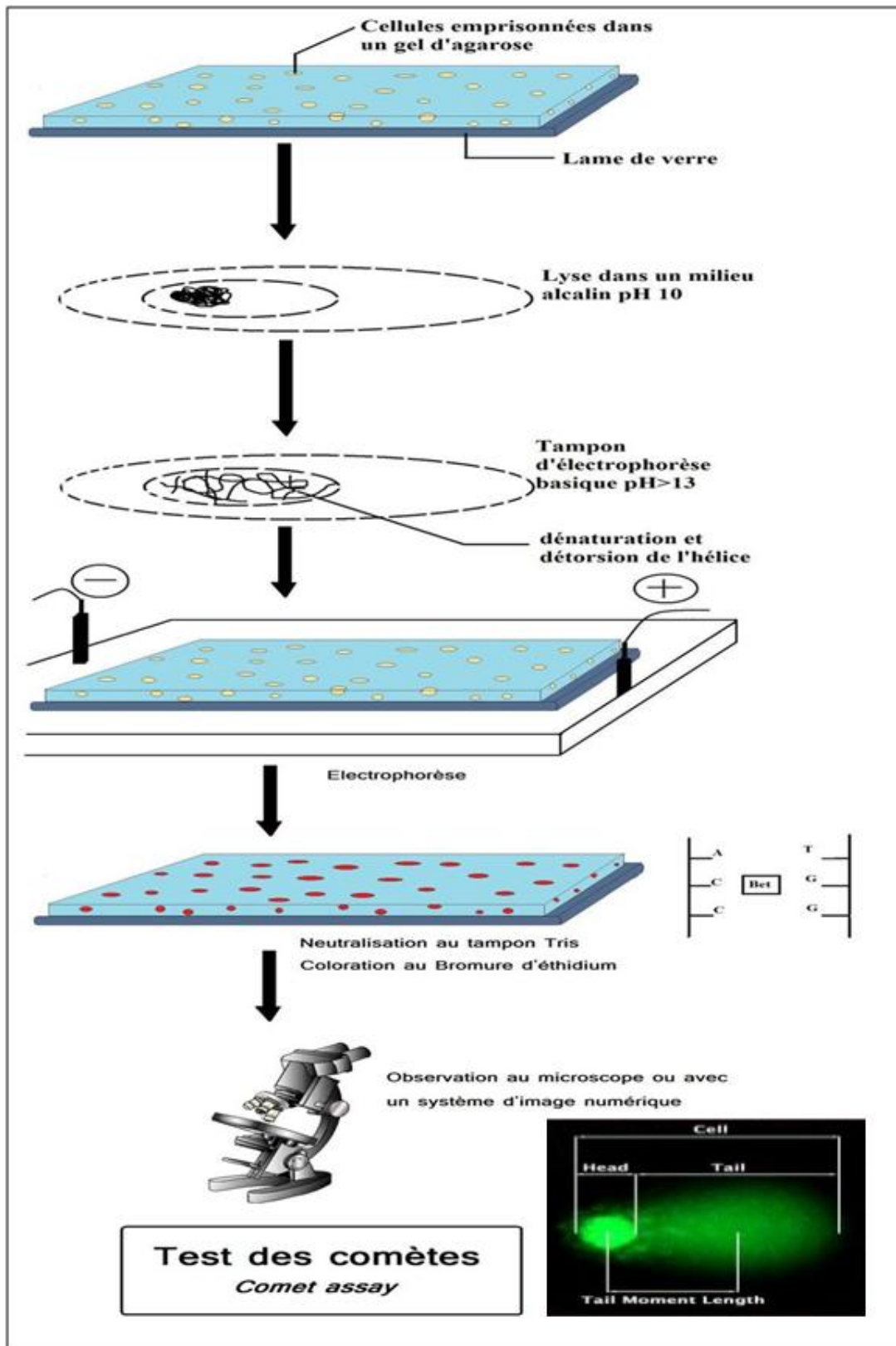


Figure 4: Principe du test des comètes (Magniez, 2010).

I.4.1.1. Applications de test des comètes

Le test des comètes peut être effectué dans des systèmes de test *in vitro* et *in vivo* et est de plus en plus utilisé dans les tests génotoxiques de produits chimiques industriels, agrochimiques et pharmaceutiques.

Le test des comètes est un outil important dans le développement précoce de médicaments en tant que prédicteur mécaniste et génotoxique (Krishna et *al.*, 2019).

I.4.1.2. Avantages de test des comètes

Le test des comètes est l'une des techniques les plus sensibles disponibles pour mesurer les dommages à l'ADN. Il est utilisé pour mesurer les dommages à l'ADN dans divers types de cellules. Les données sont mesurées à l'aide d'un logiciel et sont donc plus précises et moins sujettes aux biais expérimentaux (Simon et Carrell, 2018).

Le test des comètes est rapide (les résultats sont disponibles le même jour), simple à réaliser, le dosage ne nécessite que quelques cellules pour effectuer la procédure (Krishna et *al.*, 2019).

I.4.1.3. Limites de test des comètes

Le test des comètes ne dispose pas d'un protocole standardisé pour mesurer les dommages à l'ADN, ce qui rend difficile la compréhension et la mise en relation complètes des résultats de différents groupes de recherche. Le dosage est connu pour induire des dommages au niveau des sites labiles alcalins et il est donc difficile de faire la distinction entre les dommages endogènes de l'ADN et ceux des cassures d'ADN induites. Lors de la mesure des dommages à l'ADN dans les cellules somatiques, la présence d'ARN résiduel pourrait augmenter l'intensité du bruit de fond et affecter les résultats. L'essai est également critiqué pour la sous-estimation des dommages à l'ADN dus à l'enchevêtrement des brins d'ADN. Une décondensation incomplète de la chromatine pourrait réduire le niveau de cassures de brins d'ADN à révéler. Le chevauchement des queues de comète réduit la précision de l'analyse. Des fragments de queue plus petits sont perdus dans le gel d'agarose ou trop petits pour être visualisés au microscope. L'essai est extrêmement laborieux et est connu pour avoir un niveau élevé de variation inter-laboratoires (Simon et Carrell, 2018).

I.4.2. Test des micronoyaux

Le micronoyau a été reconnu à la fin du 19^{ème} siècle lorsque Howell et Jolly ont trouvé de petites inclusions dans le sang prélevé sur des chats et des rats. Les petites inclusions, appelées corps de Howell-Jolly, sont également observées dans les érythrocytes du sang périphérique de patients atteints d'anémie sévère (Hayashi, 2016).

Les micronoyaux sont des fragments d'ADN (fragments acentriques) ou des chromosomes entiers qui n'ont pas migré correctement pendant l'anaphase et qui vont former un second noyau de plus petite taille dans la cellule. Ils peuvent être formés suite à l'exposition des cellules à un agent génotoxique provoquant une clastogénèse ou une aneugénèse (Figure 5). Les micronoyaux sont formés naturellement à une fréquence inférieure à 1/1000 mais cette fréquence est augmentée sous l'action de certains contaminants (Pannetier, 2018).

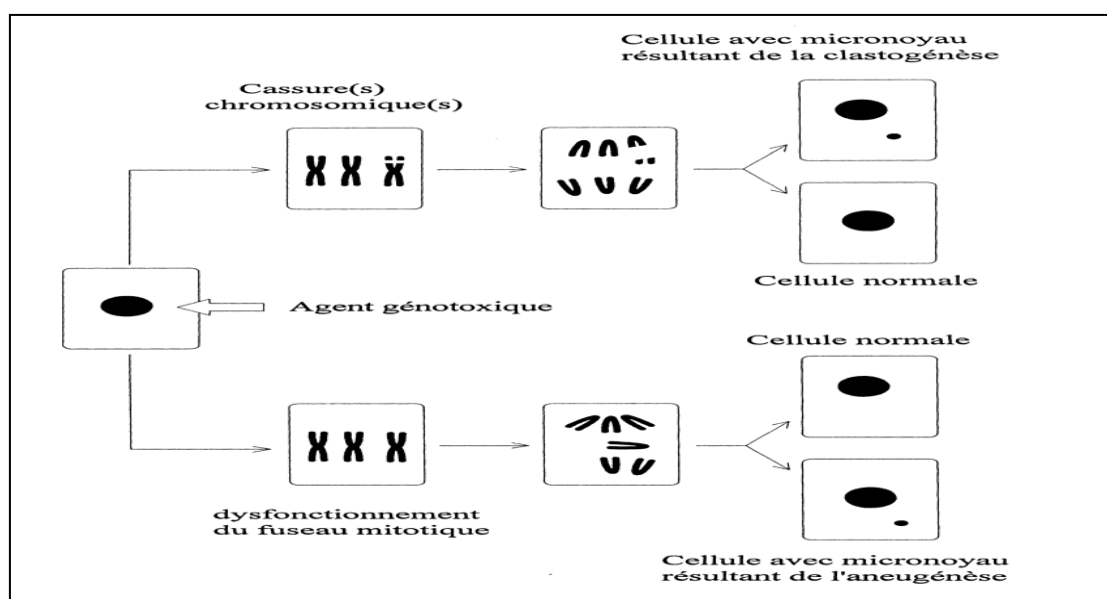


Figure 5 : Formation des micronoyaux (Cottelle, 1999)

Les MN ont l'apparence de petits objets sphériques bien distincts, qui ont la même morphologie et les mêmes propriétés de coloration que le noyau à l'intérieur du cytoplasme des cellules filles (Messal Djelti, 2018) (Figure 6).

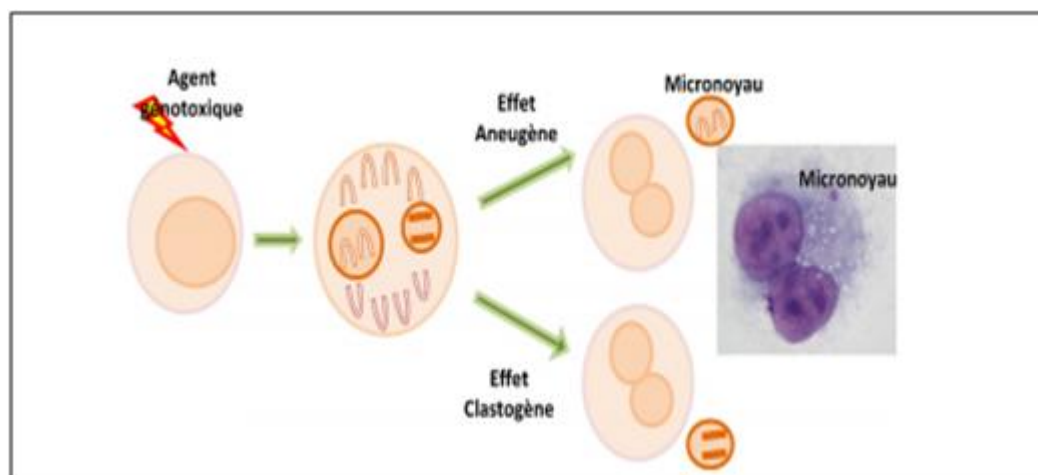


Figure 06 : Micronoyaux sous microscope (Berthelot-Ricou et *al.*, 2013).

Le test des micronoyaux a donc pour objet de détecter et énumérer les micronoyaux, dans des cellules traitées *in vitro* par l'agent génotoxique ou provenant d'une exposition *in vivo* (par exemple des lymphocytes de rongeurs ou de sujets humains exposés à l'agent génotoxique) (Fardel et *al.*, 2010).

Ce test est basé sur l'analyse d'érythrocytes prélevés dans la moelle osseuse et/ou dans les cellules du sang périphérique d'animaux, généralement des rongeurs (Messal Djelti, 2018).

I.4.2.1. Applications du test de micronoyau

Les études de radiosensibilité de divers groupes, qu'ils soient sains ou atteints de troubles génétiques, tente de lier la radiosensibilité à la réaction aux radiations des tissus normaux chez les personnes ayant subi une radiothérapie, tests prédictifs de la maladie néoplasique, caractérisations des dommages cytogénétiques au cours de la chimiothérapie et de la radiothérapie et biosurveillance de l'environnement ou des expositions professionnelles.

Le test des micronoyaux est utilisé pour la recherche fondamentale des dommages et la réparation de l'ADN, la caractérisation des dommages cytogénétiques au cours de la chimiothérapie et de la radiothérapie, la biosurveillance de l'environnement ou des expositions professionnelles et aussi utilisé comme un test prédictif des maladies néoplasiques (Sommer et *al.*, 2020).

I.4.2.2. Avantages du test de micronoyau

Le test du MN est simple à réaliser, en plus d'être rapide; ses plus grands avantages

sont la fiabilité et le coût peu élevé de la technique. Ce test est largement utilisé en épidémiologie moléculaire et en cytogénétique pour évaluer la présence et l'étendue des dommages chromosomiques dans la population exposée à des agents génotoxiques ou pour étudier un profil génétique. Le test MN peut être appliqué à plusieurs types cellulaires et permet de faire la distinction entre les cellules qui se sont divisées après l'exposition aux agents testés par l'analyse des MN dans les cellules binucléées seulement (Fenech et al., 1999).

I.4.2.3. Limites du test de MN

Les méthodes des MN présentent toutefois des limites. Une des limites de cette technique est qu'elle ne permet pas de détecter toutes les aberrations structurales (Kirsch Volders et al., 2002). De plus, le nombre de MN n'est pas entièrement proportionnel aux dommages à l'ADN. Par ailleurs, l'utilisation de la Cyt B dans le test MN pourrait causer une interférence avec certains produits chimiques, particulièrement les inhibiteurs du fuseau mitotique. Finalement, la cytotoxicité même de la Cyt B varie selon le type cellulaire, et parfois selon le sous-type de cellule employé (Kirsch Volders et al., 2002).

I.4.3. Test de Ames

Le test d'Ames, aussi appelé le test de *salmonelle*, est une analyse bactérienne à court terme employée pour recenser les substances qui entraînent des mutations géniques. Ce test mesure les dommages génétiques au niveau d'une seule base dans l'ADN (Krishna et al., 2019).

Le test d'Ames est un test de mutation génique. Il consiste à examiner si une substance chimique est capable d'induire des mutations chez une bactérie: *Salmonella typhimurium* (Whi: murizana 'his-') (Maron et Ames 1983). Les souches de *S. typhimurium*, non utilisées sont porteuses d'une mutation sur l'un des gènes gouvernant pour la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation 'his-' rend les souches incapables de se développer sur milieu de culture dépourvu d'histidine. Avec une fréquence propre à 10⁻⁶ chaque souche, ces mutations 'his-' peuvent réverter spontanément vers 'his*' (Figure 7).

Les bactéries porteuses de cette mutation réverse, peuvent alors pousser sur milieu dépourvu de cet acide aminé. La fréquence de ces mutations réverses peut être considérablement augmentée en exposant les bactéries à un agent mutagène. Le test d'Ames permet de quantifier l'induction de ces mutations réverses 'his*' (Godet, 1993).

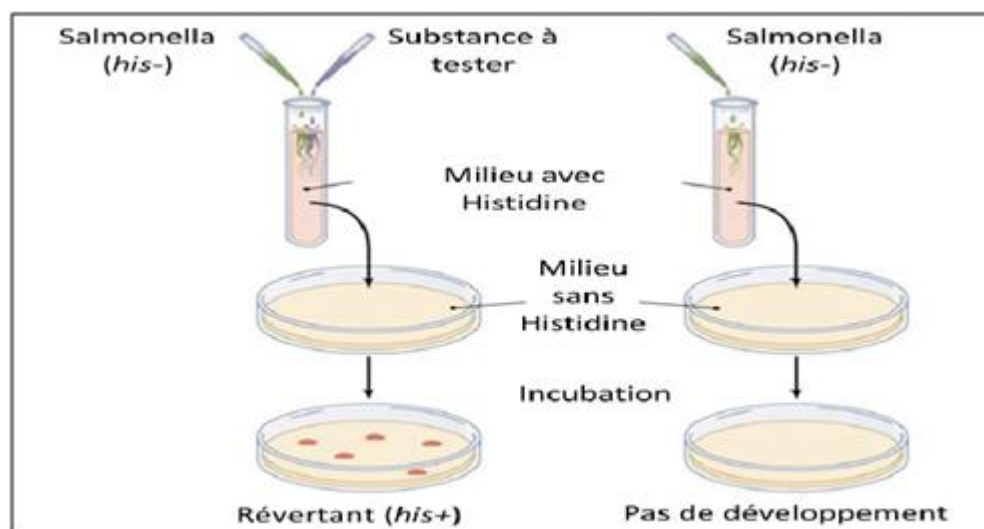


Figure 7: Principe de test de Ames(Goujon, 2015).

I.4.4. Test d'aberration chromosomique (AC)

La recherche des aberrations chromosomiques est l'un des tests de génotoxicité parmi les plus anciens utilisés en biométrie. La technique consiste à rechercher les anomalies au niveau du caryotype (l'ensemble des chromosomes). Des modifications du nombre de chromosome (aneuploidie) sont recherchées ainsi que des anomalies de structure des chromosomes (délétions, translocations, inversions...). Cette technique peut être utilement complétée par de l'hybridation in situ par fluorescence (FISH), qui permet de déterminer plus précisément les régions et séquences chromosomiques impactées, certaines d'entre elles étant connues pour leur rôle majeur dans le développement de cancers (Darne et al., 2021).

I.4.5. Echange entre chromatides sœurs (ECS)

Le ECS est considéré comme étant un indicateur simple, rapide et représentatif pour tester le potentiel génotoxique d'une variété d'agents mutagéniques et cancérigènes. Les échanges de chromatides sœurs résultent de cassures d'ADN, et de la réversion des fragments brisés à une position presque équivalente après échange entre les deux chromatides sœurs d'un même chromosome et par conséquent leur formation dépend de la phase S du cycle cellulaire ou des processus de duplication de l'ADN. Le ECS est l'un des plus importants tests démontrant une corrélation avec le cancer et les altérations de l'ADN (Dündaröz et al., 2002).

II.1. Généralité

Le cancer est une pathologie qui se caractérise par une prolifération anarchique et incontrôlée des cellules. Pour qu'un cancer se développe, il faut qu'il y ait plusieurs mutations dans le génome cellulaire. Ces mutations sont le résultat d'agressions par des facteurs environnementaux, ou d'origine naturelle lors de la division cellulaire. D'une façon générale, la thérapie des maladies cancéreuses regroupe l'ensemble des possibilités qui permettent l'excision de la tumeur et la prévention de l'apparition d'autres tumeurs localisées ou métastatiques (Bettaieb, 2009).

Les principaux traitements proposés sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Souvent, un protocole de traitement va combiner plusieurs de ces méthodes afin de maximiser les chances d'éliminer ou de diminuer la masse tumorale (Gascon, 2015). Cependant, la chimiothérapie anticancéreuse occupe une place considérable dans le traitement des cancers. Cette dernière est basée sur l'administration de médicaments ayant le pouvoir d'entraver la prolifération des cellules tumorales en induisant leur apoptose (Tigrine, 2014). Les médicaments les plus utilisés sont schématiquement les suivants: les anthracyclines ; les taxanes ; les anti métabolites comme le 5 fluoro- uracile et les alkylants, en particulier le Cyclophosphamide (Shetet *al.*, 2007).

II.2. cyclophosphamide

II.2.1. Définition

Le cyclophosphamide, 2-[bis(2-chloroethyl) amino] tetrahydro-2H- 1,3,2-oxazaphosphorine 2-oxide (CPA)]) (Belfayol et *al.*, 1995) (Figure 8), est un agent anticancéreux alkylant qui a été caractérisé pour la première fois lors d'expériences sur des tumeurs de rat. C'est une moutarde azotée à substitution oxazaphosphorine, à forte activité cytotoxique et immunosuppressive. C'est le pilier de la plupart des schémas de préparation à la transplantation d'organes et un anticancéreux largement actif, agent immunosuppresseur utilisé en chimiothérapie combinée pour la maladie de Hodgkin, le lymphome non hodgkinien, la leucémie, la polyarthrite rhumatoïde, le lymphome de Burkitt, le lupus érythémateux, la sclérose en plaques, le neuroblastome, le myélome multiple, le cancer de l'endomètre, le cancer du sein et le cancer du poumon (Muluken et *al.*, 2020).

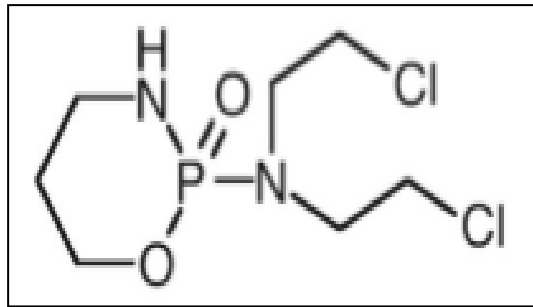


Figure 8: Structure chimique du cyclophosphamide (Caglayan, 2019).

II.2.2. Pharmacocinétique du cyclophosphamide

II.2.2.1. Absorption

Le CPA est soluble dans l'eau, solution saline ou l'alcool comme le monohydrate et peut être aisément administré oralement (Zhang et *al.*, 2006). La concentration plasmatique maximale est atteinte une heure après l'administration orale, et la demi-vie plasmatique est d'environ 7 heures; avec une biodisponibilité de 85-100 % (Garcica et *al.*, 1992 ; Zhang et *al.*, 2006).

II.2.2.2. Distribution

Après l'administration orale ou intraveineuse, le cyclophosphamide est rapidement distribué dans tout l'organisme et sa fixation aux protéines plasmatique est de 20 %, considérant que les capacités de fixation de son métabolite 4-hydroxycyclophosphamide (4-OH-CP A) sont plus hautes (<67 %). Le CPA a un volume de distribution de 30-50 L (De Joung, 2005). Plusieurs études ont suggéré que le CPA peut entrer dans le liquide céphalorachidien par la barrière hémato-encéphalique (BHE) alors que la pénétration de ces métabolites actifs dans le cerveau est limitée en raison de leur polarité accrue et leur forte fixation aux protéines plasmatique (Zhang et *al.*, 2006).

On estime que toutes les prodrogues d'oxazaphosphorine sont fortement hydrophiles et ne traversent pas facilement les membranes cellulaires. Réciproquement, les métabolites proactifs, 4-OH-CP A et l'aldophosphamide, peuvent facilement croiser les membranes de la bicouche lipidique de beaucoup de cellules par la diffusion passive (Duan et Hongbing, 2012).

II.2.2.3 Métabolisme et mode d'action

Les cytochromes P450 de la famille 2B sont les isoformes les plus impliquées dans l'activation du cyclophosphamide (CPA) en métabolites cytotoxiques ayant une activité antitumorale.

Le cyclophosphamide (Endoxan®) appartient à la famille des oxazaphosphorines (Emadi et *al.*, 2009). Chez l'homme, il est principalement métabolisé dans le foie par le CYP2B6 en 4hydroxycyclophosphamide (4-OH-CPA) (Gervot et *al.*, 1999) les métabolites cytotoxiques atteignent donc la tumeur *via* la circulation sanguine systémique.

Les CYP métabolisent le CPA en un métabolite primaire, le 4-OH-CPA qui est en équilibre avec son tautomère: l'aldophosphamide. Ce dernier peut conduire par une β -élimination spontanée, à la formation d'acroléine et d'un dérivé moutarde : la moutarde Phosphoramide (Giraud et *al.*, 2010) (figure 9).

La moutarde phosphoramide est un agent actif responsable de l'activité antinéoplasique et l'acroléine est un métabolite toxique (Iqubal et *al.*, 2019). La moutarde phosphoramide forme un cation aziridinium cyclique hautement réactif, qui peut réagir avec le N-7 de la guanine fortement nucléophile (figure 10) et avec la cytidine de l'ADN. En raison des deux fractions réactives dans la molécule, des réticulations intrastrand et interstrand peuvent se former (Ahlmann et Hempel, 2016). Cela conduit à une inhibition de la réplication d'ADN et à l'apoptose. L'acroléine, un métabolite hautement réactif, a une courte demi-vie biologique et déclenche la production des ERO (Moghe et *al.*, 2015).

Le CPA peut également être métabolisé, par une voie mineure impliquant le CYP3A4, en dichloroéthyl qui est inactif et en chloroacétaldéhyde qui est responsable d'effets toxiques sur le système nerveux et l'appareil urinaire.

Le 4-OH-CPA peut être désactivé par l'aldéhyde déshydrogénase en carboxyphosphamide qui n'a aucune activité anticancéreuse. Il a été montré sur des lignées tumorales humaines, qu'une surexpression de l'ALDH était synonyme d'une plus faible sensibilité au CPA. Le 4-OH-CPA est détoxifié par l'intermédiaire des Glutathione-S -Transférases (GST) (Touati, 2013).

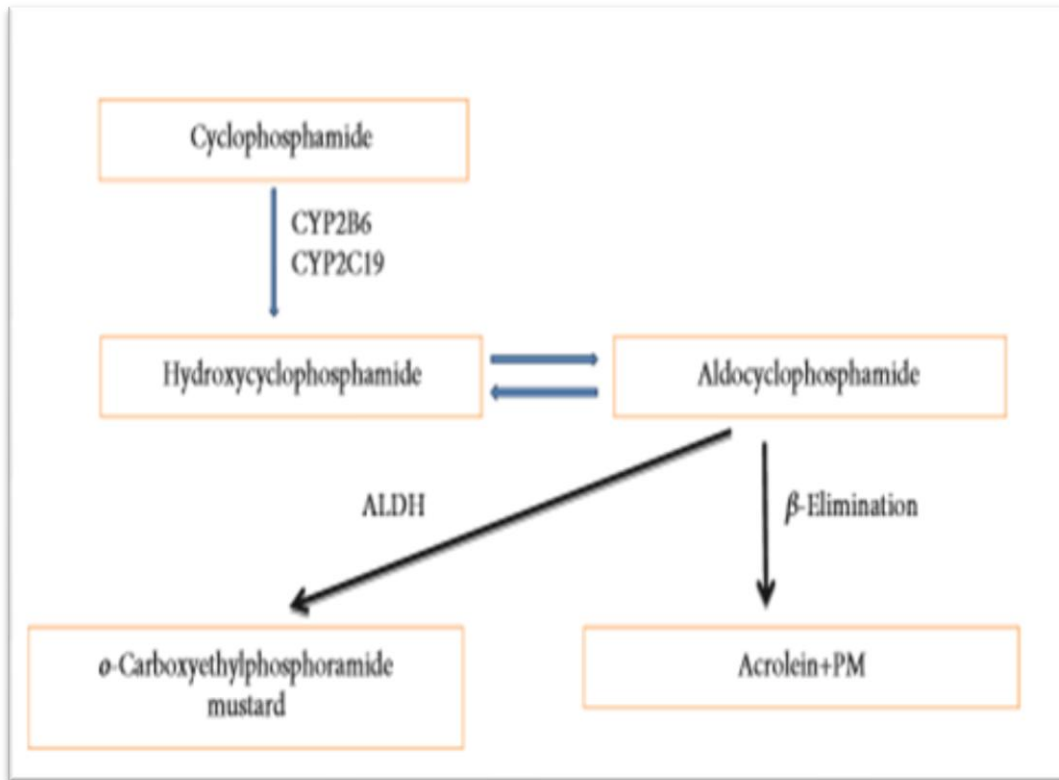


Figure 9: Voie métabolique majeure du cyclophosphamide (Muluken et al., 2020).

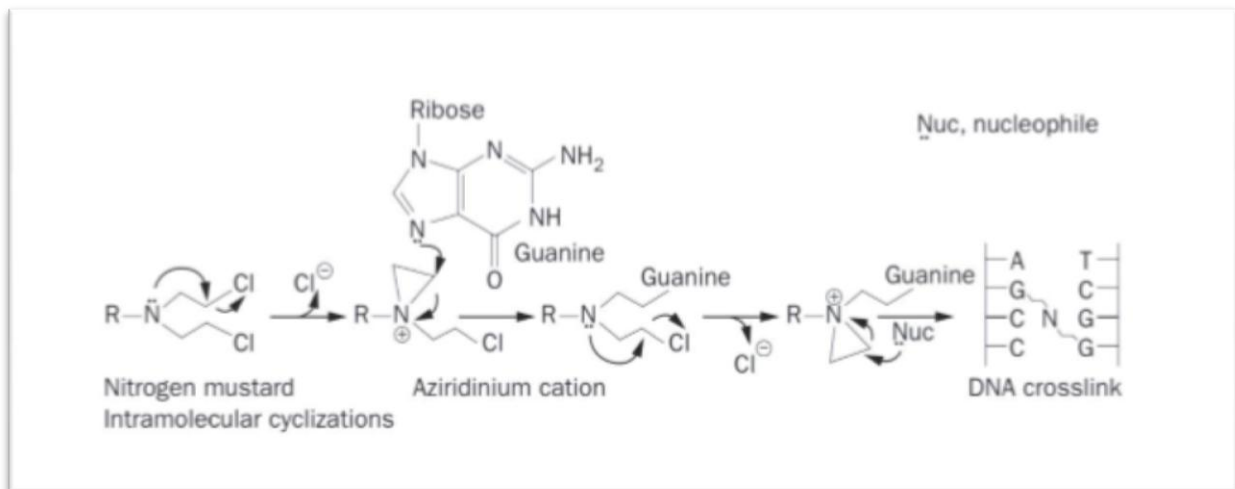


Figure 10: Formation d'ions aziridinium à partir de la moutarde azotée et son activité d'alkylation de l'ADN (Emadi et al., 2009). Dans la moutarde à l'azote, l'atome d'azote déplace le chlorure pour donner un cation intermédiaire contraint à trois membres, appelé aziridinium. Cet ion réagit facilement avec les nucléophiles. La position N-7 de la guanine dans l'ADN est fortement nucléophile et peut être facilement alkylée par le cation aziridinium. La deuxième transformation chimique de la moutarde à l'azote fournit un autre ion aziridinium qui, lors de la réaction avec un autre nucléophile d'ADN, forme une reticulation d'AND.

II. 2.2.4. Transport

Le cyclophosphamide est très hydrophile et ne diffuse pas facilement à travers la bicouche lipidique des cellules. Il nécessite un transport médié par un processus de diffusion facilité. De même, la moutarde au phosphoramidate, porte une charge négative avec un pKa de 4,5- 4,8 au pH physiologique et est donc relativement difficile à traverser la membrane cellulaire. Par contre le 4-OHCP et l'acroléine peuvent facilement traverser la membrane cellulaire par diffusion passive *in vitro* (Qiu et al., 2004).

II.2.2.5. Excretion

Le cyclophosphamide est principalement (70 %) excrété dans l'urine sous forme de métabolites et dans une moindre mesure, dans les fèces avec une demi-vie de 3 h à 12 h (Boddy et Yule, 2000). Il est également présent dans le lait maternel (Cavallasca et al., 2015). Il a été constaté que le conjugué GSH d'imino-cyclophosphamide est activement excrété dans la bile *via* la protéine MRP2 (Multidrug resistance-associated protein 2) (Qiu et al., 2004).

II.3. Effets indésirables du cyclophosphamide

Le cyclophosphamide (CPA) est le médicament chimiothérapeutique le plus couramment utilisé pour divers types de cancer. Cependant, son utilisation provoque une cytotoxicité sévère pour les cellules normales chez l'homme. Il est bien connu que les effets secondaires indésirables sont dus à la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

II.3.1. Cyclophosphamide et stress oxydatif

Le CPA est principalement métabolisé par le système enzymatique du cytochrome P450 dans le foie après administration systémique est converti en deux composés de base comme la moutarde phosphoramidate et l'acroléine. La moutarde phosphoramidate est responsable de l'activité antinéoplasique basique et agit comme un agent alkylant de l'ADN indépendant du cycle cellulaire, tandis que l'acroléine est responsable des effets cytotoxiques en provoquant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans l'organisme, et aussi interfère avec les antioxydants tissulaires et les enzymes antioxydantes, conduisant à une brèche dans le système de défense antioxydant normal qui entraînerait une accumulation ininterrompue de ERO (Basua., et al., 2015).

Dans le cycle cellulaire normal, les ERO endogènes sont produites aux stades de la respiration mitochondriale de l'activité NADPH oxydase et de l'oxydation des peroxyosomes (figure 10). En outre, les ERO peuvent être produits de manière exogène (rayonnement ionisant ou ultraviolet, agents

chimiothérapeutiques et stimuli environnementaux) au niveau cellulaire. Lorsqu'ils sont produits à de faibles concentrations, ces radicaux sont neutralisés par une activité antioxydante naturelle (telle que GSH, SOD, GPx, CAT), alors qu'une activité élevée de ERO affecte négativement l'homéostasie intracellulaire en provoquant un arrêt du cycle cellulaire, un dysfonctionnement cellulaire et des dommages à l'ADN qui en résultent. Ceci est particulièrement montré comme la cause de la cytotoxicité induite par la chimiothérapie de CPA (YilmazI, 2018).

Les défenses antioxydantes cellulaires impliquant les enzymes, la SOD et la CAT détoxifient les radicaux libres et le stress oxydatif qui en résulte. La SOD catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 et O_2° . L'hépatotoxicité induite par la CPA est associée au stress oxydatif causé par la réduction des activités de ces enzymes antioxydantes. Dans la présente observation, les activités de la SOD et les CAT dans le foie ont été significativement réduites par le traitement par CPA, indiquant un stress oxydatif prononcé (Bhattacharjee, 2014).

IL a été rapporté que le stress oxydatif et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont toxiques. Ils ont été impliqués dans la physiopathologie et de la toxicité induite par le CPA. De plus, la biotransformation du CPA passe par l'implication des oxydases à fonction mixte du cytochrome P450 avec la formation de métabolites; la moutarde phosphoramidate et l'acroléine qui sont hautement toxiques (Mahmoud, 2014).

Une étude menée par Ahmadi et ses collaborateurs, (2008) a rapporté que par cette voie, le CPA a le potentiel de générer des ROS superflus.

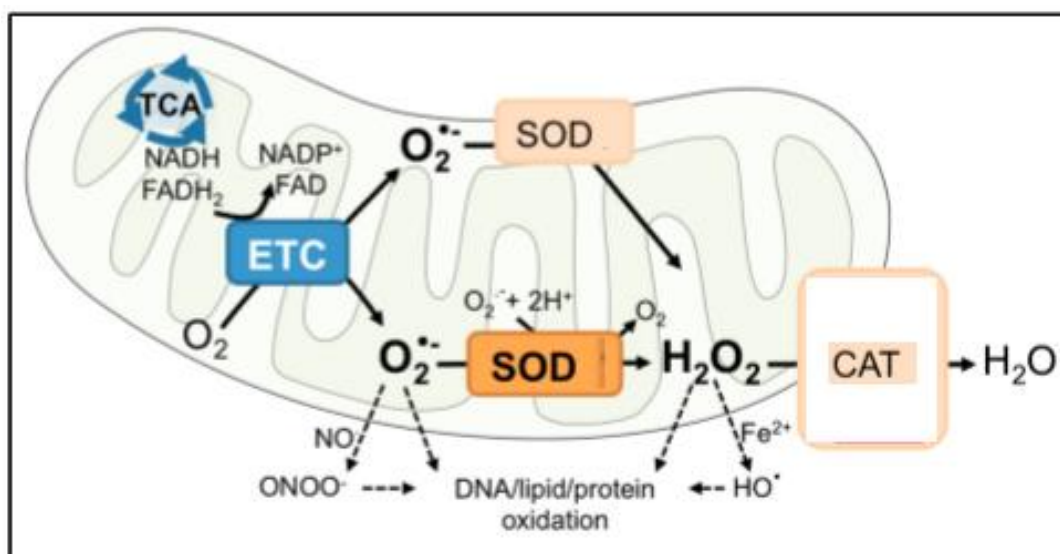


Figure 11: Production des ERO au niveau de la mitochondrie (Kim *et al.*, 2017).

II.3.2. Génotoxicité du cyclophosphamide

Le CPA est un médicament cytostatique qui agit de manière non spécifique à la fois sur les cellules tumorales et sur les cellules saines normales, en se liant à l'ADN et en interférant avec le cycle cellulaire (Gamal-Eldeen et *al.*, 2013). L'exposition chronique au CPA peut entraîner des mutations qui entraînent une cytotoxicité, une cancérogénicité, une tératogénicité et toxicité pour la reproduction (Bhattacharjee et *al.*, 2015; Nafees et *al.*, 2015). Les aberrations chromosomiques et les micronoyaux sont considérés comme des marqueurs de l'instabilité génomique qui conduit à la mutation et finalement au cancer (Basu et *al.*, 2015 ; Gamal-Eldeen et *al.*, 2013).

Le potentiel clastogène de CPA a été confirmé dans une étude réalisée par Arin Bhattacharjee en 2014. Après observation d'une incidence élevée d'aberrations chromosomiques et de formation de micronoyaux dans la moelle osseuse des souris traitées par cyclophosphamide par voie intrapéritonéale à une dose de 25 mg/kg p.c. (bhattacharjee et *al.*, 2014).

Le test des comètes permet la détection de dommages à l'ADN de divers types, tels que les cassures double brin, simple brin, les sites labiles aux alcalis, les sites de réparation incomplète et les liaisons croisées. La réalisation du test des comètes sur les lymphocytes du sang périphérique des souris traitées par cyclophosphamide par voie intrapéritonéale à la dose de 25 mg/kg pendant 10 jours consécutifs a montré que le traitement avec la CPA a induit une augmentation significative du pourcentage de cellules endommagées et de la longueur de la queue par rapport au groupe non traité (Basua et *al.*, 2015).

Dans une autre étude, le traitement par le CPA a induit des aberrations chromosomiques structurales et des échanges de chromatides sœurs chez les embryons, les villosités chorales humaines et les cellules germinales à divers stades de la spermatogenèse (Farouk et *al.*, 2015).

II.2.4.3. Autres effets indésirables du cyclophosphamide

II.2.4.3.1. Cardiotoxicité

Les dommages cardiaques induits par le cyclophosphamide dépendent de la dose, avec des patients qui reçoivent plus de 150 mg/kg ou 1,55 g/m²/jour, qui présentent un risque élevé de cardiotoxicité. Le facteur dose-limitant au cours du traitement par cyclophosphamide provoque une cardiotoxicité irréversible. Une cardiomyopathie mortelle a été rapportée chez 2 à 17 % des patients prenant du cyclophosphamide. La physiopathologie des dommages cardiaques induits par le CPA est mal comprise, bien que ses métabolites soient censés induire un stress oxydatif et des dommages capillaires endothéliaux directs avec une extravasation résultante de protéines, d'érythrocytes et de

métabolites toxiques. En présence de métabolites toxiques, la dégradation des cellules endothéliales contribue à endommager directement le Myocarde et les vaisseaux sanguins capillaires entraînant un œdème, une hémorragie interstitielle et la formation de microthromboses. Les cellules endothéliales sont plus sensibles aux dommages induits par le CPA que les autres cellules ; cela pourrait être associé à leur taux de prolifération élevé ; La génération d'espèces réactives de l'oxygène induite par le CPA peut également conduire à une réduction de la biodisponibilité de l'oxyde nitrique, conduisant ainsi à une fonction endothéliale compromise. Les mécanismes moléculaires des dommages cardiaques induits par le CPA sont actuellement postulés, ce qui pourrait conduire à de meilleures stratégies préventives pour traiter la cardiotoxicité (AltayeAyza et *al.*, 2020).

II 2.4.3.2. Hépatotoxicité

La toxicité hépatique est un problème majeur associé à l'utilisation du cyclophosphamide (Shokrzadeh et *al.*, 2015). Le cyclophosphamide possède de puissants effets indésirables hépatiques qui comprennent principalement des réactions oxydatives et inflammatoires (Nafees et *al.*, 2012; Zhu et Bazemore-Walker, 2013).

Le métabolisme du cyclophosphamide et la dégradation de ses métabolites par les enzymes hépatiques, notamment les cytochromes CYP3A4, CYP2C9 et la CYP2B6 (De Jonge et *al.*, 2005), augmentent la production de NO hépatique; Le NO peut réagir avec les anions superoxydes pour former du peroxynitrite (ONOO^-), un puissant oxydant biologique qui altère les fonctions mitochondriales et cellulaires et augmente la production de ERO. Ces ERO peuvent réagir avec différents composants de la cellule. Parmi les dommages qui résultent de cette interaction: la peroxydation lipidique ainsi que des cassures de l'ADN en modifiant les bases puriques et pyrimidiques. En effet, qui le principal métabolite du cyclophosphamide, le 4-hydroxy cyclophosphamide (4-OHCP) induit la peroxydation lipidique dans différents tissus y compris le foie (Stankiewicz et Skrzydlewska, 2003).

III .1. Généralités

L'Algérie bénéficie d'un climat très diversifié avec une hétérogénéité des conditions écologiques qui ont permis le développement d'une flore très riche et hautement variée. La flore algérienne comporte environ 3164 espèces de plantes vasculaire dont 7,9% sont endémiques appartenant à la quasi-totalité des familles botaniques. L'une de ces espèces à usage très fréquent par les populations rurales en Algérie est *Pistacia lentiscus. L* (Cheraft, 2011).

Le lentisque (*Pistacia lentiscus. L*), Darou en arabe local et Amadagh en kabyle, est un arbrisseau de 1 à 3m de hauteur appartient a la famille des Anacardiaceae, qui comprend environ 70 genres et plus de 600 espèces, distribué au bassin méditerranéen à l'Asie centrale (Charef *et al.*, 2008 ; Lahsissene *et al.*, 2009 ; Bozorgi *et al.*, 2013).

III.2. Etude botanique et Taxonomique de *Pistacia. L*

III.2.1. Description botanique

Cet arbrisseau de 1 à 3 mètres de hauteur, est courant en sites arides de la région méditerranéenne (de l'Asie, l'Europe, l'Afrique, jusqu'aux Canaries) (figure.12) (Maameri – Habibatni, 2014).

Les feuilles de ce petit ligneux sont persistantes, paripennées, avec 4 à 10 folioles elliptiques, coriaces et luisantes et le pétiole est nettement ailé. On trouve des pieds mâles et femelles distincts (espèce dioïque) qui fleurissent en grappes denses en mois de Mai (Hans, 2007).

Les fleurs, brunâtres, constituent des denses grappes spiciformes. Elles sont à l'origine de petites drupes rouges, puis noires à maturité, subglobuleuses (Boullard, 2001). On différencie les fleurs femelles des fleurs mâles grâce à leur couleur, vert jaunâtre pour les femelles et rouge foncé pour les mâles. Les fleurs mâles et femelles poussent sur des arbustes différents, les mâles ont 5 petits sépales dont émergent 5 étamines rougeâtres reposant sur un disque nectarifère. Les femelles, à 3 ou 4 sépales à un ovaire supère avec un style court à 3 stigmates. Floraison de Mars à Mai (Belfadel, 2009).

Fruit, Est une baie globuleuse (de 2 à 3 mm), monosperme, remplie par nucléole de la même forme; d'abord rouge, il devient brunâtre à sa maturité, qui est complète à l'automne.

Mastic, Si l'on incise le tronc de ce végétal, il s'en écoule un suc résineux nommé mastic qui, une fois distillé, fournit une essence employée en parfumerie (Belfadel, 2009).



Figure 12 : Photographies de *Pistacia lentiscus*. (A) Aspect général de la plante (B) Les fleurs (C) Les feuilles et les baies (D) La résine.

III.2.2. Place dans la systématique

D'après Quézel et Santa (1963), la position des lentisques dans la systématique du règne végétal est donnée par l'arbre phylogénique

Tableau N° 01: Classification taxonomique de *Pistacia lentiscus* L.(Djedaia, 2017)

Règne	Plantae
Embranchement :	Spermaphytes
Sous embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédone
Sous classe	Dialypétales
Série	Diacifores
Ordre :	Sapindale
Famille	Anacardiacées
Genre	<i>Pistacia</i>
Espèce	: <i>Lentiscus</i>

III.2.3. Répartition géographique de *Pistacia lentiscus* .L

Pistacia lentiscus L pousse à l'état sauvage dans la garrigue et sur les sols en friche. On le retrouve sur tout type de sol, dans l'Algérie subhumide et semi-aride, plus précisément dans le bassin du Soummam en association avec le pin d'Alep, le chêne vert et le chêne liège (figure.13) (Bougherara et Merzougui, 2014)

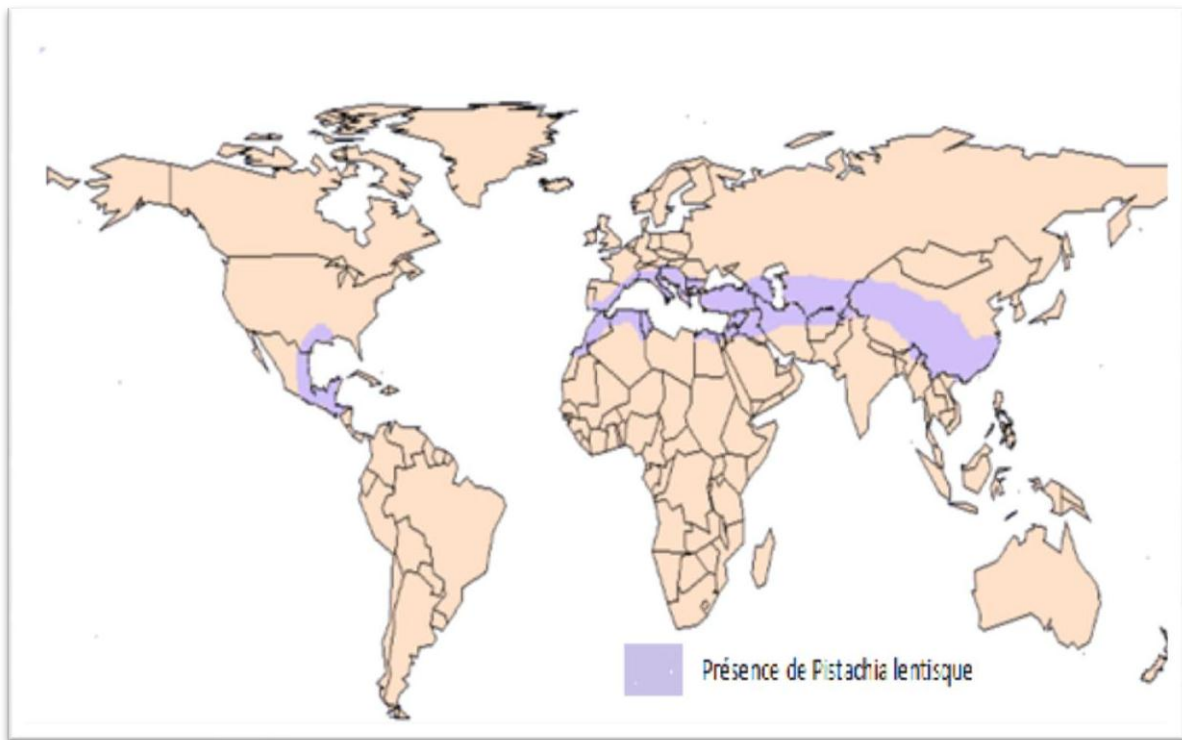


Figure 13 : Aire de répartition du genre *Pistacia* (Belfadel, 2009)

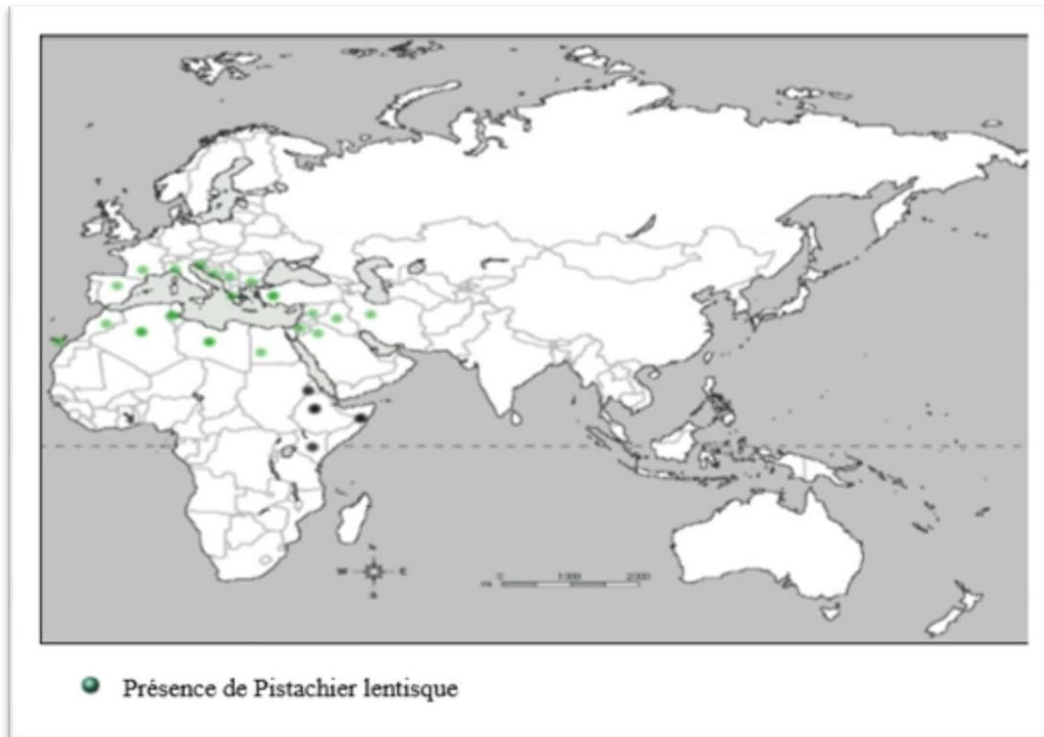


Figure 14: Distribution de *Pistacia lentiscus* dans le bassin méditerranéen (AL-Saghir, 2006)

III.3. Criblage phytochimique de la plante

Comme d'autres plantes du genre *Pistacia*, le lentisque contient des centaines, voire des milliers de substances chimiques actives, l'analyse phytochimique des différentes parties :

La composition chimique des feuilles de *Pistacia lentiscus* est caractérisée par la présence de plusieurs types de flavonoïdes, comme la quercétine glycosylé, la myricétine glycosylé, la luteoline, la catéchine ainsi que l'isoflavone genisteine. Elles contiennent 6 à 7 % de gallotannins de faible poids moléculaire, à savoir l'acide gallique et les dérivés d'acide quinique 5-O-, 3,5-O-di- et 3, 4,5-O-trigalloyl. (Romani et al., 2002).

De même, les fruits sont riches en tannins, en monoterpènes (myrcène, α -pinène et limonène) (Baba-Aissa, 1999; Castola et al., 2000), en flavonoïdes et les dérivés de galloyl incluant galloyl-glucosides, ellagitannins et acide galloyl-quinic (Bhourri et al., 2010), en acides phénoliques, notamment l'acide gallique (Addelwahed et al., 2007). On trouve aussi les acides gras insaturés comme l'acide oléique et linoléique (Charaf et al., 2008)

Quant à l'huile essentielle représente 0,14- 0,17% du poids des feuilles de *Pistacia lentiscus*. Les études phytochimiques effectuées sur les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles de lentisque ont montré la présence de longifolène, α -pinène, β -pinène, γ -cadinène, trans- β -terpinéol, α -acomeol, γ -muurolène, Sabinène et terpinén-4-ol. (Dobeta et al., 2006).

La résine d'odeur forte, en forme jaune qui est obtenue par incision du tronc; est formée de 80 à 90% d'acide masticique et de 10 à 20% de masticine. L'huile essentielle de mastic est un liquide incolore, d'odeur balsamique très prononcée, cette essence constituée principalement de α -pinène, β -cymène et triterpénoïdes (Cheraft, 2011).

III.4. Utilisations de *Pistacia lentiscus*

III.4.1. Utilisations traditionnelles

Pistacia lentiscus L. est connu pour ses propriétés médicinales depuis l'antiquité ; en effet, les médecines traditionnelles pratiquées de part et d'autre des rives de la méditerranée, attribuent au lentisque des vertus dans le traitement des ulcères, l'hypertension, la toux, les maux de gorge, l'eczéma, des calculs rénaux et la jaunisse (Gardeli et al., 2008).

Le mastic de *Pistacia* a été utilisé par les guérisseurs traditionnels pour le soulagement des douleurs abdominales, des maux d'estomac, la dyspepsie et l'ulcère gastroduodéal (Al Habbal et al., 1984).

Les feuilles sont utilisées comme anti-inflammatoire, antibactérien, antifongique, antipyrétique, hépatoprotective, expectorante et cicatrisant (Djedaia, 2017).

L'huile de fruits du lentisque est souvent utilisée comme un remède d'application externe locale sous forme d'onguent pour soigner les brûlures ou les douleurs dorsales (Bammou et al., 2014).

III.4.2. Utilisations biologiques

Plusieurs études ont mis en évidence une variété d'activités des différentes parties de *Pistacia lentiscus* L, on cite :

III.4.2.1. Activité antioxydante

Des études récentes ont montré que toutes les parties de *Pistacia lentiscus* L. présentent une riche source d'acides phénoliques et de flavonoïdes, principalement représentés par les acides hydroxybenzoïques et les flavonols. Ces composés sont en grande partie responsables de l'activité antioxydante de *Pistacia lentiscus* L. Cela est dû aux propriétés redox des polyphénols, qui permettent leur utilisation en tant qu'agents réducteurs, donneurs d'hydrogène, chélateurs de métaux et extincteurs à oxygène unique et permettent par

conséquent l'exposition d'un large éventail d'effets biologiques positifs (Ivona Elez et al., 2020).

Les extraits de feuilles riches en phénols totaux, flavonoïdes et tannins, présentent un fort potentiel antioxydant et une forte inhibition des dommages d' H_2O_2 dans la lignée cellulaire THP-1 (Remila et al., 2015). L'extrait aqueux de feuilles de *P. lentiscus L.* est une boisson très populaire dans les pays d'Afrique du Nord et devient de plus en plus populaire dans le monde entier à cause de ses propriétés bénéfiques pour la santé (Dahmoune et al., 2014).

alors que dans autre l'effet antioxydant de *Pistacia lentiscus L.* a été déterminé en mesurant leur capacité à supprimer la peroxydation lipidique induite par le fer dans l'homogénat de foie de rat (Ansari et al., 2012).

III.4.2.2. Activité hépatoprotectrice

Les observations après administration orale de l'extrait aqueux des feuilles de *Pistacia lentiscus* (bouillis et non bouillie) à des rats, intoxiqués par un mélange de CCl_4 et de l'huile d'olive, par voie intrapéritonéale, ont démontré que cet extrait exerce une activité anti-hépatotoxique, en réduisant l'activité des trois enzymes hépatique (phosphatase alcaline (ALP), alanine aminotransférase (ALT) et aspartatamino-transférase (AST) ainsi que le taux de bilirubine dans le sang (Janakat et Al-Merie, 2002).

III.4.2.3. Activité anticancéreuse

Tous les extraits des feuilles, des fruits et de la tige ont été soumis à un criblage cytotoxique contre les cellules cancéreuses CaCo2 et AGS. Des extraits au méthanol (8:2) de la feuille ont montré une activité cytotoxique élevée envers les lignées cellulaires CaCo2 et AGS.

Fait intéressant, la toxicité la plus élevée a été observée pour l'extrait de feuille au méthanol (8:2) dans les deux lignées cellulaires cancéreuses, indiquant l'effet synergique des composés présents dans l'extrait entier. La cytotoxicité de l'extrait de feuille contre les cellules AGS et CaCo2 était significativement plus élevée que les autres extraits.

Une implication importante de ces résultats est qu'une exposition de 24 heures à l'extrait de feuille réduit efficacement la viabilité des cellules tumorales avec. En revanche, les extraits de fruits et de tiges n'étaient pas cytotoxiques contre les lignées cellulaires de

carcinome gastrique humain et d'adénocarcinome du côlon humain. En effet, les feuilles ont montré une activité antioxydante et anti-radicalaire significative par rapport aux fruits et à la tige, ce qui peut expliquer la teneur élevée en polyphénols (Romani et al., 2002).

III.4.2.4. Activité antiulcéreuse

L'activité protectrice du PLFO (*Pistacia lentiscus* L. fattyoil) a été démontrée par une moindre étendue des dommages gastriques dans les groupes prétraités et traités, par rapport au groupe éthanol seul. Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que le PLFO pourrait agir comme une couche protectrice similaire au mucus, recouvrant la muqueuse gastrique. Le PLFO pourrait également induire la sécrétion de mucus par les cellules caliciformes. Cela empêcherait ou inhiberait le contact de la muqueuse gastrique avec l'éthanol, fournissant ainsi protection renforcée et préservation de l'intégrité de l'épithélium gastrique.

En revanche, l'administration prophylactique et/ou thérapeutique de PLFO atténué les lésions muqueuses. Le traitement PLFO a considérablement préservé l'intégrité morphologique de la muqueuse gastrique traitée à l'éthanol, (Bouteminea et al., 2018).

III.4.2.5. Activité anti-inflammatoires

Les propriétés anti-inflammatoires des composés polyphénoliques dues à leurs capacités d'inhiber des enzymes impliquées dans les processus inflammatoires (Škerget et al., 2005) et réduit la migration des leucocytes vers le tissu endommagé et aussi inhibé la formation des médiateurs pro-inflammatoires des cytokines telles que TNF- α , IL-1 et IL-6, qui jouent des rôles critiques dans les processus inflammatoires (Mease, 2002). L'huile essentielle de PLL contient des principes actifs à effet anti-inflammatoires et est efficace dans le traitement de diverses conditions inflammatoires.

III.4.3. Utilisation industrielle

L'huile essentielle de *Pistacia lentiscus* est largement utilisée en parfumerie et dans les industries alimentaires et pharmaceutiques (Dhifi et al., 2013). La gomme mastic est aussi employée en pâtisserie, en confiserie, comme arôme en technologie alimentaire, dans les industries cosmétologiques et pharmaceutiques, mais aussi dans l'industrie photographique et dans la fabrication de liqueurs (Barazani et al., 2003; Kivçak et Akay, 2005).

IV. Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie à l'Université de Jijel. Cette étude est portée sur l'évaluation de l'effet protecteur des produits naturels (extrait de feuilles de PLL) contre la génotoxicité du cylophosphamide chez la souris NMRI.

IV.1. Etude phytochimique de la plante**IV.1.1. Matériel végétal**

Les feuilles de PLL ont été récoltées au mois de Mars 2020 à partir de la région de Texenna, wilaya de Jijel. Tous les échantillons ont été nettoyés des impuretés, séchés à l'abri de la lumière et stockés à température ambiante dans un endroit sec jusqu'à leur utilisation. Ensuite, ils ont été broyés à l'aide d'un broyeur électrique. Et la poudre du végétal a été tamisée par un tamis de 500 µm, le broyat ainsi obtenu est conservé au sec.

IV.1.2. Extraction des composés phénoliques et des flavonoïdes

Les composés phénoliques et flavonoïdes ont été extraits à partir des feuilles de cette plante par deux méthodes différentes : Extraction par macération dans l'éthanol, extraction avec de l'eau chaude.

IV .1.2.1. Préparation de l'extrait éthanolique

La macération (extraction solide- liquide) est une opération qui consiste à laisser séjourner la matière végétale (broyat) dans l'éthanol pour en extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes). Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par (Hamia et *al.*, 2014). Selon le protocole impliquant une macération de 50 g de la poudre végétale dans l'éthanol (500 ml) le mélange est laissé macérer pendant une semaine, ensuite filtré sur un papier filtre Wattman N°1 et le filtrat est ainsi récupéré dans un flacon, cette procédure est répétée trois fois. Enfin les trois macérats éthanoliques sont poolés et soumis à une évaporation à sec de l'éthanol à 65°C dans un évaporateur rotatif de type Rotavapor ® 300. L'extrait de couleur verte (extrait éthanolique) (Chevoleau *et al.*, 1992 ; Naczki et Shahidi, 2006).

IV.1.2.2. Préparation de l'extrait aqueux

Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par Nshimiyimana et He, (2010). Le protocole de la macération est le suivant :

50 grammes de la poudre végétale sont ajoutés à 500 ml d'eau distillée puis agités manuellement et doucement ensuite chauffés dans un bain-marie à 67 °C pendant 60 minutes. Le mélange est refroidi à température ambiante et filtré sur un papier filtre Wattman n°1, cette procédure est répétée trois fois le filtrat aqueux ainsi obtenu est évaporé dans les mêmes conditions que l'extrait précédent.

IV.1.3. Rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction.

Les rendements d'extraction (éthanolique et aqueux) sont calculés suivant la formule ci-dessous (Boubekri, 2014).

$$R\% = \frac{Me}{Mé} \times 100$$

R% : rendement en pourcentage.

Me : masse de l'extrait sec en gramme.

Mé : masse de l'échantillon en gramme.

IV.1.4. Le criblage phytochimique des extraits

IV.1.4.1. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux a été déterminé par spectrophotométrie, selon la méthode colorimétrique utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce dosage est basé sur la quantification de la concentration totale de groupements hydroxyles présents dans l'extrait. Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par Singleton et Rossi, (1965). Brièvement, dans des tubes à hémolyse en verre, un volume de 200 µl de chaque extrait aqueux ou éthanolique ont été ajoutés à un mélange de 1 ml de réactif Folin-Ciocalteu dilué 10 fois et 800 µl d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 7,5 %. Les tubes sont agités et conservés pendant 30 min. L'absorbance est lue à 765 nm.

Une courbe d'étalonnage a été réalisée en parallèle dans les mêmes conditions en utilisant l'acide gallique à différentes concentrations (0 à 1000 µg/ml) (Annexe 1).

IV.1.4.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La quantification des flavonoïdes a été effectuée par une méthode basée sur la formation d'un complexe très stable, entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.

Le protocole utilisé est basé sur celui décrit par Zhishen et ses collaborateurs (1999) et Kim et ses collaborateurs (2003).

Dans un tube à hémolyse en verre, 400 µl d'extrait, ou d'étalon, ou de l'eau distillée pour le témoin, ont été ajoutés à 120 µl de NaNO₂ à 5 %. Après 5 minutes d'incubation, 120 µl d'AlCl₃ à 10 % ont été additionnés, et le milieu est mélangé vigoureusement. Après 6 minutes, un volume de 800 µl de NaOH à 1 M a été ajouté au milieu. L'absorbance est lue immédiatement à 510 nm contre le témoin. Une solution éthanolique de quercitrine a été préparée. Des solutions filles préparées à partir de la solution mère à différentes concentrations comprises entre (0 et 1000 µg/ml), permettront de tracer la courbe d'étalonnage (Annexe 2).

IV.1.4.3. Dosage des tanins condensés

Nous avons adopté la méthode à la vanilline avec l'HCl. Cette méthode dépend de la réaction de la vanilline avec le groupement flavonoïde terminal des TCs et la formation de complexes rouges, cela s'explique par la propriété des tanins à se transformer en anthocyanidols de couleur rouge par réaction avec la vanilline. La teneur en tanins condensés a été déterminée par la méthode de vanilline décrite par Julkunen-Titto, (1985).

Un volume de 50 µl de chaque extrait aqueux et éthanolique a été ajouté à 1500 µl de la solution vanilline/méthanol à 4 %, puis mélangé vigoureusement. Ensuite, un volume de 750 µl de l'acide chlorhydrique concentré (HCl) a été additionné. Le mélange obtenu est laissé réagir à température ambiante pendant 20 min. L'absorbance est mesurée à 550 nm contre un blanc. Différentes concentrations comprises entre (0 et 1000 µg/ml) préparées à partir d'une solution mère de la catéchine, permettront de tracer la courbe d'étalonnage (Annexe 3).

IV.2. Evaluation du pouvoir antioxydant *in vitro*

IV.2.1. Pouvoir réducteur de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Pour étudier l'activité du piégeage du H₂O₂, nous avons utilisé la méthode décrite par Ruch et ses collaborateurs (1989) et Bozin et ses collaborateurs (2008). Pour

ce faire, 3,4 mL de l'extrait brut aqueux ou éthanolique (extrait de feuilles) à 3 concentration (0.0001g/ml) préparés dans une solution tampon phosphate à 0.1 M (pH 7.4) sont mélangés avec 600 µL d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 43 mM (préparée dans le même tampon phosphate). La réaction des échantillons avec le peroxyde d'hydrogène est suivie à l'aide d'un spectrophotomètre à 230 nm après 10 min d'incubation. Dans les mêmes conditions opératoires, l'acide gallique, la quercitrine et l'acide ascorbique aux mêmes concentrations choisies, sont utilisés comme contrôle positif.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% \text{ du piégeage du H}_2\text{O}_2 = [(AC - AT) / AC] \times 100$$

AC : Absorbance du contrôle

AT : Absorbance de l'échantillon

IV.2.2. Test de piégeage des radicaux hydroxyles (OH[°])

Les radicaux hydroxyles sont les plus réactifs, ils peuvent oxyder des acides aminés, produire des coupures de brin d'ADN et des modifications des bases puriques et pyrimidiques. Ils peuvent attaquer les lipides membranaires et les lipoprotéines, initiant ainsi la peroxydation lipidique (Kebbsa, 2018).

Ce test a été réalisé selon la méthode décrite par Türkan Kutlu, (2014). 1ml de chaque extrait (aqueux ou éthanolique) à différentes concentrations (0.1mg/ml, 0.01mg/ml et 0.001mg/ml) est ajouté à 1 ml de FeSO₄ (1.5 mM), 0.7 ml de H₂O₂ (6 mM) et 0.3 ml de salicylate de sodium (20 mM). Après 1 h d'incubation à 37°C, l'absorbance du mélange réactionnel est lue à 562 nm. L'acide ascorbique a été utilisé comme contrôle positif. La capacité de piégeage des radicaux hydroxyles a été calculée en utilisant l'équation suivante.

$$I (\%) = [(A1 - A2) / A1] \times 100.$$

Où :

A1 : absorbance du contrôle.

A2: absorbance de l'essai.

IV.3. Etude de l'effet *in vitro* des extraits éthanolique et aqueux sur le stress oxydatif mitochondrial induit par le cyclophosphamide**IV.3.1. Isolement des mitochondries hépatiques**

Dans cette étape nous avons utilisées le foie de poulet sacrifié le jour de la manipulation expérimentale afin de faire l'isolement des mitochondries hépatiques dans le but d'étudier l'effet *in vitro* de deux extraits de PLL sur les activités enzymatiques de la SOD et la CAT.

Toutes les étapes d'isolement des mitochondries se font à 4°C au contact de la glace. Les mitochondries de foie ont été préparées suivant le protocole décrit par Jonhson et lardy, (1967). Le foie est prélevé à partir d'un poulet sacrifié le jour de

l'isolement. Pour ce faire, 5g de foie frais sont pesée, coupés en petits morceaux et rincés deux fois dans du tampon de TSE (250mM Sucrose, 50mM Tris, 5mM EGTA, pH 7.2 à 4°C). Les morceaux de foie sont ensuite homogénéisés dans le Potter (Broyeur de DOUNCE) contenant 15 ml de tampon TSE. L'homogénéisation est réalisée afin de casser les cellules et² libérer les mitochondries par aller/retour du piston dans le Potter.

Les mitochondries sont séparées des extraits membranaires et du cytosol par centrifugation de l'homogénat à 600g (1770 tr /min, rotor HS-4, centrifugeuse Sigma 3-16PK) pendant 10 min a 4°C. Le surnagent obtenue est ensuite centrifugé à 15000g (11000tr/ min, rotor SM 24, centrifugeuse Sigma 3-16PK) pendant 5min à 4°C. Après élimination du surnagent, le culot contenant les mitochondries, est remis en suspension dans 1ml de tampon TSE (250mM Sucrose, 50mM Tris, 5mM EGTA, pH 7.2 à 4°C) et centrifugé à 15000g pendant 5min à 4°C. La même opération est répétée après reprise du culot dans le tampon TS (250mM Sucrose, 50mM Tris, pH 7.2 à 4°C).

Le culot obtenu est ensuite remis en suspension dans 200µl de tampon TS.

IV.3.2. Dosage des protéines

La concentration totale en protéine des échantillons est déterminée par la technique mise au point par Bradford, (1976). Cette méthode consiste en un dosage colorimétrique en utilisant le bleu de Coomassie qui a la propriété de s'adsorber sur les protéines de manière non spécifique et indépendamment de leur séquence. Cette adsorption s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption de la molécule avec virage au bleu. Le changement de l'absorbance est proportionnel à la concentration en protéines dans l'échantillon.

Elle est basée sur la complexation des acides aminés aromatiques présents dans les protéines avec le Bleu Brillant de Coomassie (BBC). Pour cela, 50 µL de la suspension ou de la matrice mitochondriales diluées à 1/10^{ème} avec de l'eau distillée (50 µL BSA pour la gamme étalon) sont ajoutés à 2.5 ml du réactif bleu brillant de Coomassie (BBC). Après agitation et incubation à température ambiante pendant 5 min, la lecture de l'absorbance est effectuée à 595 nm. La concentration des protéines exprimée en gramme est déduite de la courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions par la BSA (Bovin Serum Albumin) (Annexe 4).

IV.3.3. Stimulation des mitochondries hépatiques *in vitro*

Après le dosage des protéines par la méthode de Bradford, la suspension mitochondriale a subi plusieurs traitements à différentes concentrations.

Dans un volume final de 500µL, le volume de 400µL de la suspension mitochondriale correspondant à une concentration en protéine de 2 mg/ml a été ajouté à

50µl de tampon TS et 50µl de la substance à tester à différentes concentrations. Les échantillons sont préparés comme suit :

Essaie 1 (blanc) : 100µl tampon TS + 400µl matrice mitochondriale.

Essaie 2 (cyclo) : 50µl de TS + 50µl cyclo + 400µl matrice mitochondriale.

Essaie 3 (cyclo + extrait aqueux) : 50µl cyclo + 50µl extrait aqueux + 400 µl du matrice mitochondriale.

Essaie 4 (cyclo + extrait éthanolique) : 50µl cyclo + 50µl extrait éthanolique + 400 µl du matrice mitochondriale.

Après cinq minutes d'incubation une centrifugation de 15000 rpm pendant 20 min à 4°C a été effectuée

Le culot mitochondrial obtenu est suspendus dans 100 µL de la solution hypotonique (25mM KH₂PO₄, 5mM MgCl₂, ph=7.2).

La suspension mitochondriale est subdivisée en aliquotes pour effectuer l'extraction de la matrice mitochondriale.

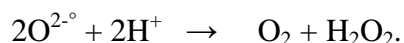
IV.3.4. Extraction de la matrice mitochondriale

Les mitochondries traitées et récupérées dans la solution hypotonique ont subis une série de 6 à 8 congélation-décongélation répétées avec broyage vigoureux après chaque décongélation afin d'éclater les mitochondries et libérer les enzymes mitochondriales, puis une centrifugation de 20min a été effectué à 9600 rpm à 4°C.

Le surnagent obtenue est utilisée comme source enzymatique qui sert pour la mesure des activités SOD et CAT (Belli et *al.*, 2010).

IV.3.4.1. Mesure de l'activité enzymatique de la Superoxyde dismutase (SOD)

La SOD est une enzyme antioxydante très importante dans le maintien d'une basse concentration de d'anion superoxyde. Elle catalyse la dismutation de l'O²⁻ en peroxyde d'hydrogène et en oxygène selon la réaction suivante:



L'activité enzymatique du superoxyde dismutase mitochondriale (Mn/SOD) a été déterminée selon la méthode décrit par Marklund et Marklund (1974). La mesure de l'activité de cette enzyme est basée sur la capacité de la SOD à inhiber l'auto-oxydation du pyrogallol.

Cette auto-oxydation en présence d'EDTA est inhibée par la SOD jusqu'à 90% avec un pH entre (7.9 à 9.1), ce qui indique la dépendance de l'anion superoxyde dans cette auto-oxydation (Kim et *al.*, 1994). Pour mesurer l'activité de la SOD, on a mis dans la cuve de mesure: 850µL de tampon tris HCl (50mM, pH=8.2), 15 µL de la fraction mitochondriale, 100µL de l'EDTA (10mM) et enfin 50µL de pyrogallol (2.5 mM dans HCL 10mM). La lecture de la DO est effectuée à 420 nm chaque minute pendant 5 minutes dès l'ajout du pyrogallol. Les résultats sont exprimés en UI de SOD / mg de protéines, une unité de l'activité de la SOD est définie comme la quantité d'enzyme qui causerait l'inhibition de 50% de l'auto-oxydation du Pyrogallol. L'activité enzymatique en terme d UI /mg de protéine selon la formule suivante:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\frac{\text{DO contrôle}}{\Delta T} - \frac{\text{DO échantillon}}{\Delta T}}{\Delta T * \text{DO contrôle}} * 100$$

$$\text{SOD UI/mg de protéines} = \% \text{d'inhibition} / n * 50.$$

n : quantité de protéine en mg dans le volume de l'échantillon utilisé.

IV.3.4.2. Mesure de l'activité enzymatique de la Catalase

La catalase ou CAT est une enzyme antioxydante qui agit en synergie avec la SOD pour accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

L'activité de la catalase a été déterminée selon la méthode de (Clairbone, 1985). Le principe est basé sur la disparition de l'H₂O₂ en présence de la source enzymatique à 25° C. En bref, la cuve de mesure contient 1 ml du tampon phosphate (KH₂PO₄ 0.1M, pH 7.2), 0.975 ml de peroxyde d'hydrogène (0.019M) et 0.025 ml de la source enzymatique. La lecture de la DO est effectuée à 560 nm chaque minute pendant 2 minutes. L'activité enzymatique est exprimée en UI/mg de protéines de protéines selon la relation suivante :

$$\text{UI/mg de protéine} = (2,3033/T \cdot \text{Log } A1/A2) / \text{mg de protéines.}$$

Avec :

A1: Absorbance au temps 0 min.

A2: Absorbance après 1 min.

T: Intervalle de temps en minutes.

IV.4. Etude *in vivo* de l'effet de l'extrait aqueux des feuilles de PLL contre la génotoxicité du cyclophosphamide

Nous avons réalisé cette étude pour évaluer l'effet génoprotecteur de l'extrait aqueux de feuilles de PLL sur la génotoxicité d'un médicament anticancéreux largement utilisé en chimiothérapies le cyclophosphamide chez la souris femelle NMRI.

IV.4.1. Entretien des animaux

Les expériences sont réalisées sur 20 souris femelles NMRI, fournis par l'institut Pasteur d'Alger, pesant entre 25g et 35g. Les animaux sont maintenus dans des cages en polypropylène, avec libre accès à la nourriture et à l'eau. L'animalerie est soumise à une température entre 20 et 27°C et une photopériode de 12/24 h.

IV.4.2. Répartition et traitement des animaux

Les animaux sont répartis en quatre groupes avec dans chaque groupe cinq souris.

Groupes 1 (T -) : reçoit les véhicules des traitements.

Groupes 2 (EA) : les animaux reçoivent l'extrait aqueux à une dose 100mg/kg pendant 10 jours par voie orale.

Groupes 3 (CPA, T+) : les animaux reçoivent le cyclophosphamide à une dose 40mg/kg à j0 par voie I.P.

Groupes 4 (EA+CPA) : les animaux reçoivent l'extrait aqueux à une dose 100mg/kg pendant 10 jours par voie orale, le cyclophosphamide à une dose 40mg/kg par voie I.P a j0.

Le choix de dose de cyclophosphamide est adapté selon le protocole expérimental décrit dans la ligne directrice de l'OCDE (OCDE, 2019).

IV.4.3. Sacrifice des animaux et prélèvement du sang

Dix-huit à 24h après le dernier traitement les souris sont décapitées, le sang est recueilli dans des tubes eppendorfs contenant du Na₂EDTA, afin de réaliser le test de micronoyaux.

IV.4.4. Test de micronoyaux

Par une micropipette une goutte du sang périphérique qui à l'état frais est déposée sur une lame et étalée par une lamelle pour obtenir un frottis (Krishna et Hayashi, 2000). La lame est séchée à l'air libre et fixée par le méthanol pendant 2-5 min, puis colorée par le réactif de May-Grunwald pendant 3 min, nous déplaçons chaque échantillon sur le colorant Geimsa à 5-10% pendant 20min (Sandoz, 1972 ; Krishna et Hayashi, 2000).

IV.4.4.1. Observation microscopique et Dénombrement des cellules

Le micronoyau apparaît dans les érythrocytes dans le sang circulant ou dans les érythroblastes dans la moelle osseuse comme une petite masse colorée en violet (après coloration MGG). Il témoigne de la génotoxicité du médicament.

Les lames sont observées au microscope optique (objectif à immersion, grossissement x 100). Pour chaque animal, on détermine la proportion d'érythrocytes ayant un micronoyau par rapport au nombre total d'au moins 2000 érythrocytes dans le sang périphérique de l'animal (Gollapudi et McFadden, 1995) Selon la relation.

$$\% \text{ MN} = \frac{n}{2000} * 100$$

Où **n** représente de nombre d'érythrocytes micronucléus.

IV.5. Etude statistique

Les résultats sont donnés sous forme de moyennes ± écart-types. Pour la comparaison on a été utilisé le test T de Student qui nous donne le degré de signification (P) réalisé par le logiciel Excel (2008 Microsoft Corporation)

IV.5.1. Testes du pouvoir antioxydante (OH[°], H₂O₂)

(*) Désigne un effet significatif (p < 0,05), (**) désigne un effet hautement significatif (p < 0,01), (***) désigne un effet très hautement significatif (p < 0,001) en comparaison avec l'extrait aqueux.

(#) Désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (#) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (#) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec l'extrait éthanolique, ns : désigne un effet non significatif ($p > 0,05$).

IV.5.2. L'étude *in vitro* de l'activité enzymatique mitochondrial (SOD, CAT) et l'étude *in vivo* (le teste des micronoyaux)

(*) Désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (**) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (***) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec le témoin négatif.

(#) : Désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (##) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (###) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec le cyclophosphamide seul, ns : désigne un effet non significatif ($p > 0,05$).

V. 1. Résultats

La présente étude a été effectuée au niveau du laboratoire de Toxicologie Moléculaire et le laboratoire de Biologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie à l'université Mohamed Seddik Ben Yahia de Jijel, elle porte sur l'évaluation de l'effet protecteur de l'extrait des feuilles de PLL de la région de Jijel (Texenna) contre le stress oxydatif et la génotoxicité induites par le cyclophosphamide chez la souris l'utilisation du test de micronoyaux *in vivo* a été réalisé mettant en évidence la génotoxicité ainsi que la mesure de l'activité antioxydante *in vitro* de l'extrait utilisé.

V.1. 1. Exploration phytochimique de la plante

Les techniques d'extraction utilisées ont permis d'aboutir à deux différents extraits éthanolique et aqueux.

V.1.1.1. Rendement d'extraction des composés phénoliques

L'extraction des principes actifs est effectuée à partir de 50g de matière sèche des feuilles de PLL avec les solvants organiques et aqueux pour en extraire le maximum de composés bioactifs. L'évaporation à sec des extraits a été effectuée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Bouch R-300). Les résultats du rendement d'extraction sont représentés dans le tableau -2-ci-dessous.

Tableau N° 2 : Rendement d'extraction par rapport au solvant d'extraction

Extrait	Rendement d'extraction %
Extrait aqueux	44.88%
Extrait éthanolique	25.7%

D'après les résultats obtenus, on a constaté que le rendement de l'extrait aqueux (44.88%) est plus élevé par rapport au rendement de l'extrait éthanolique (25.70%).

V.1.1.2. Teneurs en composés phénoliques

Un dosage des polyphénols, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés a été effectué sur les extraits aqueux et éthanolique de PLL.

Les extraits préparés à partir des échantillons de PLL, les valeurs des concentrations et les l'écart type correspondant sont exprimées en mg d'équivalent d'acide Gallique par gramme matière sèche (mg EAG/gMS) pour les polyphénols et en mg d'équivalent de la quercétine par gramme de matière sèche (mg EQ/gMS) pour les flavonoïdes totaux et en mg d'équivalent de la catéchine par gramme de matière sèche (mg EC/g MS) pour les tanins condensés.

Les résultats sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau N°3 : Les teneurs en polyphénols, flavonoïdes et tanins des deux extraits de PLL

Extrait	Aqueux	Ethanolique
Concentration des polyphénols (mgEAG/gMS)	114.70 ±0.14	146.53 ± 0.56
Concentration des flavonoïdes (mg EQ/gMS)	45.70 ±0.72	22.90 ± 0.66
Concentration des tanins (mgEC/gMS)	86.14 ±15.38	12.01 ±0.56

Le dosage des polyphénols montre que l'extrait brut aqueux contient 114.70 ±0.14 mg EAG/g MS. Cependant, l'extrait éthanolique contient 146.53 ± 0.56 mg EAG/g MS.

Le dosage des flavonoïdes montre que l'extrait brut aqueux contient 45.70 ±0.72mg EQ/g MS. et l'extrait éthanolique contient 22.90 ± 0.66mg EQ/g MS.

Le dosage des tanins montre que l'extrait brut aqueux contient 86.14 ±15.38mg EC/g MS et l'extrait éthanolique contient 12.01 ±0.56 mg EC/g MS. D'après le tableau on constate que l'extrait aqueux contient la teneur la plus élevée en flavonoïdes et tanins par rapport à l'extrait éthanolique qui contient la teneur la plus élevée en polyphénols.

Les dosages spectrophotométriques des polyphénols, des flavonoïdes totaux et des tanins condensés pour les deux extraits (aqueux et éthanolique) ont révélé la présence des ces composés dans les extraits.

IV.1.2. Evaluation du pouvoir antioxydant *in vitro*

Différentes méthodes permettent de déterminer « *in vitro* » le pouvoir antioxydant dans les composés purs ou dans les extraits de plantes (Belhachat, 2019)

Dans ce travail, la mesure du pouvoir réducteur de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et test de piégeage des radicaux hydroxyles (OH°), ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits des feuilles de PLL.

IV .1.2.1. Pouvoir réducteur du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

Une des méthodes les plus communes pour évaluer la capacité du piégeage du peroxyde d'hydrogène est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine de l'UV. Comme la concentration de H_2O_2 diminue par les composés piègeurs, la valeur d'absorbance de ce dernier à 230 nm diminue également. Néanmoins il est tout à fait normal que les échantillons absorbent également à cette longueur d'onde, ainsi l'exécution d'une mesure blanche est indispensable (Boumeras et Naga, 2018).

Les résultats de l'effet des deux extraits des feuilles du PLL par rapport à l'acide gallique, la quercitrine et l'acide ascorbique qui représente leur pouvoir réducteur du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont exprimés dans la figure 15.

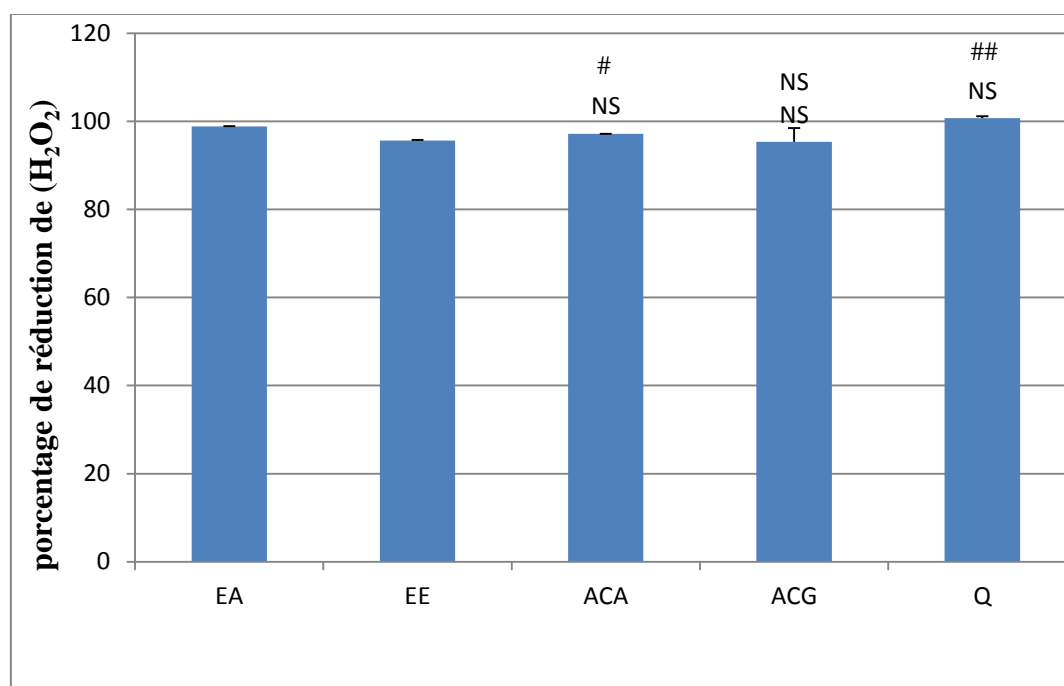


Figure 15 : Pourcentage de réduction de H_2O_2

EA : extrait aqueux, EE : extrait éthanolique, ACA : acide ascorbique, ACG : acide gallique, Q : quercétine. Test de Student : (*) désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (**) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (***) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec l'extrait aqueux, (#) désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (##) désigne un effet

hautement significatif ($p < 0,01$), (###) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec l'extrait éthanolique, ns : désigne un effet non significatif ($p > 0,05$).

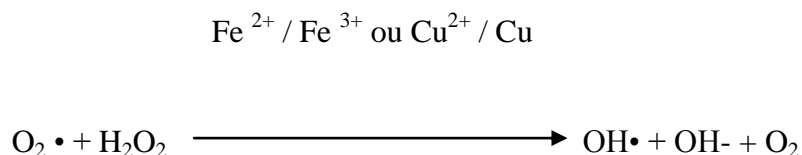
Nos résultats montrent que l'extrait aqueux de PLL présente une activité non significative ($p > 0,05$) du pourcentage de réduction de H_2O_2 de l'ordre de $(98,87 \pm 0,05 \%)$ par rapport à l'acide ascorbique ($97,18 \pm 0\%$) et l'acide gallique ($95,32 \pm 3,12\%$). Cependant, une diminution non significative ($p > 0,05$) du pourcentage de réduction de H_2O_2 de l'extrait aqueux a été enregistrée par rapport à celui de la quercitrine ($100,73 \pm 0,44\%$).

L'extrait éthanolique de PLL a montré une capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) de l'ordre de $(95,63 \pm 0,19 \%)$ qui est inférieure d'une manière significative ($P < 0,05$) par rapport à l'acide ascorbique ($97,18 \pm 0 \%$) et non significative ($p > 0,05$) par rapport à l'acide gallique ($95,32 \pm 3,12\%$) mais d'une manière hautement significative ($P < 0,01$) par rapport à la quercitrine ($100,73 \pm 0,44\%$).

IV.1.2.2. Test de piégeage des radicaux hydroxyles (OH°)

C'est une espèce radicalaire très agressive, responsable de la plupart des dommages oxydatifs des biomolécules. Il a été rapporté comme le radical oxydant le plus puissant qui peut interagir au niveau du site de sa génération avec la plupart des molécules (ADN, protéines, lipides, acides aminés et sucres) (Pisochi et Pop, 2015).

La présence d'ions métalliques catalyse la voie connue comme la réaction de Fenton. Dans ce procédé, le substrat, qui est le peroxyde d'hydrogène, génère le radical hydroxyle (Moniczewski et al., 2015)



La figure 16 montre la capacité de piégeage des radicaux hydroxyles (OH°) par les deux extraits des feuilles de PLL en comparaison avec l'acide ascorbique.

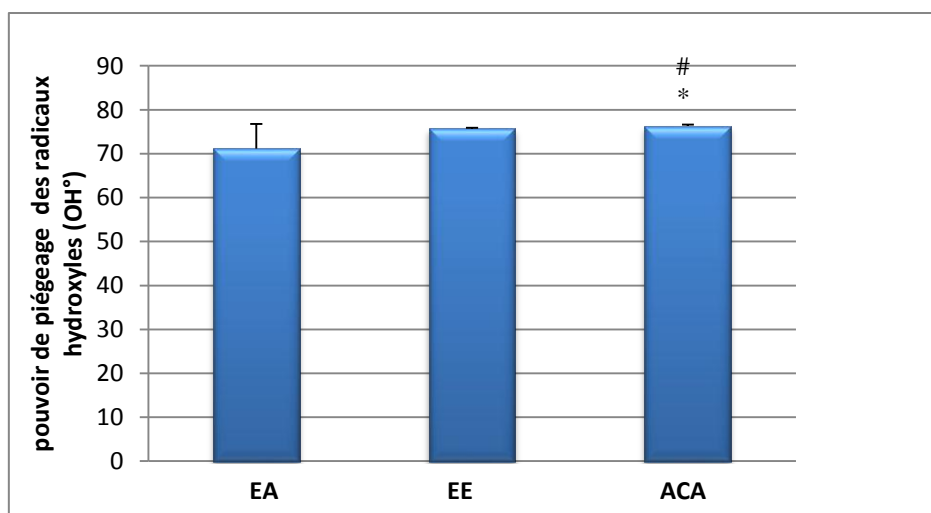


Figure 16 : Pouvoir de piégeage des radicaux hydroxyyles (OH°)

Test de Student : () désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (**) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (***) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec l'extrait aqueux, (#) désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (##) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (###) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec l'extrait éthanolique, ns : désigne un effet non significatif ($p > 0,05$).*

L'effet antioxydant des deux extraits des feuilles de PLL est comparé à celui de l'acide ascorbique qui est considéré comme un contrôle positif. À partir de la figure nous pouvons constater que l'extrait aqueux de PLL (71.14 ± 5.6 %) représente une diminution significative ($P < 0,05$) du pouvoir de piégeage des radicaux hydroxyyles (OH°) de celui de l'acide ascorbique (76.32 ± 0.27 %). Aussi il ya une diminution significative ($P < 0,05$) du pouvoir de piégeage des radicaux hydroxyyles (OH°) d'extrait éthanolique de PLL (75.75 ± 0.13 %) par rapport au acide ascorbique qui représente un antioxydant de référence ceci suggère que l'extrait de PLL peut être utilisé comme un antioxydant.

IV.1.3. Etude de l'effet *in vitro* des extraits éthanolique et aqueux de PLL sur le stress oxydatif mitochondrial induit par le cyclophosphamide

La conversion des ROS en intermédiaires moins toxiques par les antioxydants enzymatiques représente une autre voie importante de désintoxication contre les dommages oxydatifs induits par le cyclophosphamide. La superoxyde dismutase et la catalase sont les principales enzymes impliquées dans le mécanisme de défense antioxydante puisqu'elles sont impliquées dans l'élimination directe des ROS.

IV .1.3.1. Mesure de l'activité enzymatique de la superoxyde dismutase SOD

La fonction principale de la SOD enzyme assurant la dismutation des radicaux superoxydes en le convertissant en H_2O_2 protégeant ainsi la cellule contre les dommages oxydatifs causés par la peroxydation lipidique (Kamaraj *et al.*, 2009).

Les résultats de variations de l'activité de la SOD mitochondriale, après différents traitements par le cyclophosphamide, cyclophosphamide-extrait aqueux et cyclophosphamide-extrait éthanolique par rapport au témoin sont présentés dans la figure 17.

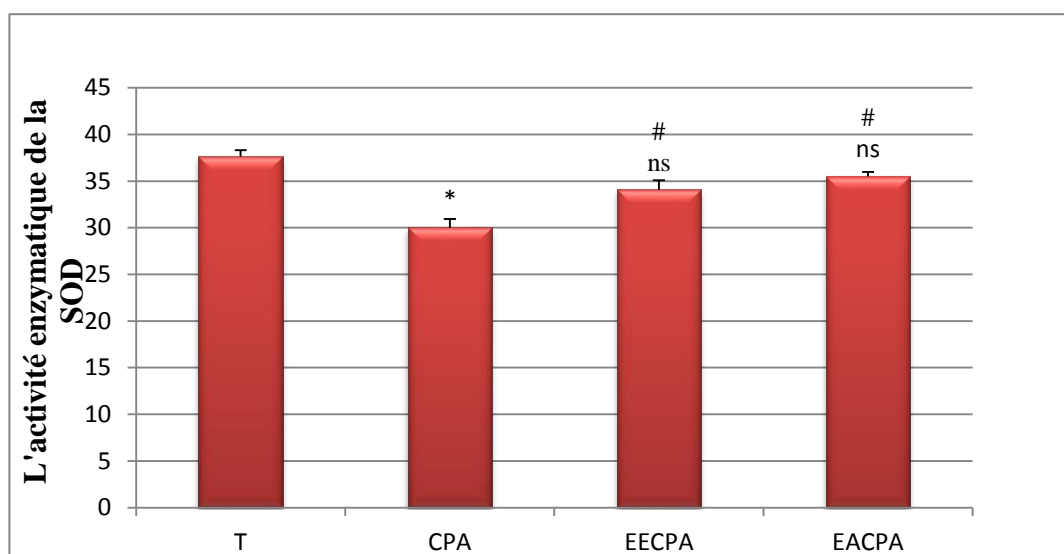


Figure 17 : Variations de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase Mitochondriales

T : témoin négatif, CPA : groupe traité par le cyclophosphamide, EECPA : groupe prétraité par l'extrait éthanolique et le cyclophosphamide, EACPA : groupe prétraité par l'extrait aqueux et le cyclophosphamide.

Test de Student : (*) désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (**) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (***) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec le témoin négatif, (#) : désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (##) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (###) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec le cyclophosphamide seul, ns : désigne un effet non significatif ($p > 0,05$).

Nos résultats montrent que le traitement des mitochondries par le cyclophosphamide ($10\mu M$) provoque une diminution significative ($P < 0,05$) de l'activité enzymatique du superoxyde dismutase (SOD) mitochondriale (30.01 ± 0.91 UI/mg de protéines) par rapport au témoin négatif (aucun traitement) (37.6 ± 0.68 UI/mg de protéines).

D'après les résultats trouvés, une augmentation significative ($P < 0,05$) de l'activité enzymatique de la SOD mitochondriale a été enregistrée chez les mitochondries traitées par les deux extraits de feuilles de PLL ; EECPA ($34.06 \pm 1,01$ UI/mg de protéines) et EACPA

(35.50 ± 0.46 UI/mg de protéines) par rapport au groupe traité par le cyclophosphamide seul (30.01 ± 0.91 UI/mg de protéines) mais une diminution non significative ($p > 0,05$) de cette activité par rapport au témoin négatif (37.6 ± 0.68 UI/mg de protéines).

IV.1.3.2. Mesure de l'activité enzymatique de la catalase (CAT)

Le rôle de la catalase est de catalyser la dégradation du peroxyde d'hydrogène généré lors du stress oxydatif dans les cellules tumorales (Kim et Lee, 1997).

Les résultats de l'effet de PLL sur l'activité enzymatique de la CAT sont représentés dans la figure 18.

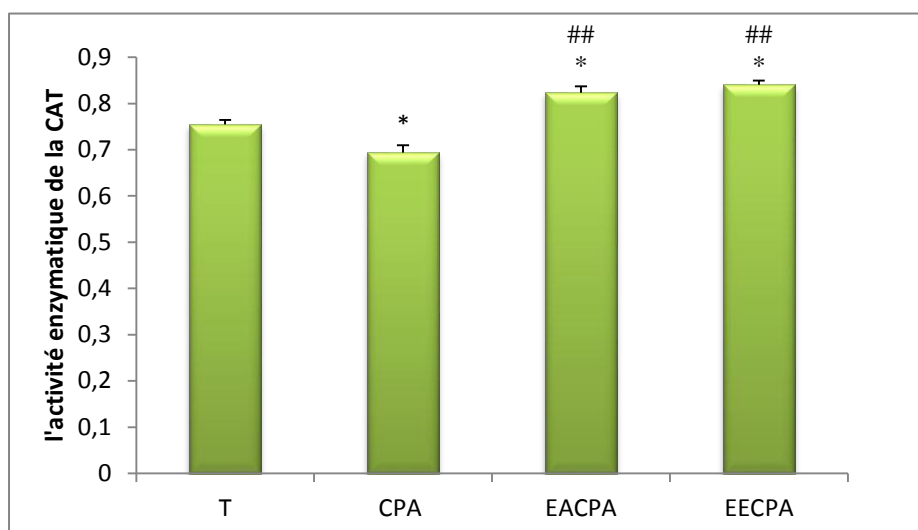


Figure 18 : Les différentes variations de l'activité enzymatique de la catalase (CAT).

T : témoin négatif, CPA : groupe traité par le cyclophosphamide, EECPE : groupe prétraité par l'extrait éthanolique et le cyclophosphamide, EACPA : groupe prétraité par l'extrait aqueux et le cyclophosphamide.

Test de Student : (*) désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (**) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (***) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec le témoin négatif, (#) : désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (##) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (###) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec le cyclophosphamide seul, ns : désigne un effet non significatif ($p > 0,05$).

Les résultats obtenus montrent une diminution significative ($P < 0,05$) de l'activité enzymatique de la catalase mitochondriale après stimulation des mitochondries par le cyclophosphamide ($0,69 \pm 0,009$ UI/mg de protéine) par rapport au témoin négatif (aucun traitement) (0.75 ± 0.009 moles H_2O_2 /min/ mg de protéines).

Cependant, une augmentation hautement significative ($P < 0,01$) de l'activité enzymatique de la CAT a été observée chez les mitochondries traitées par les deux extraits de PLL ; EACPA ($0,82 \pm 0,015$ UI/mg de protéine) et EECPA ($0,84 \pm 0,014$ UI/mg de protéine) par rapport aux mitochondries traitées par le cyclophosphamide seul ($0,69 \pm 0,009$ UI/mg de protéine), et une augmentation significative ($P < 0,05$) de cette activité par rapport au témoin négatif ($0,75 \pm 0,009$ UI/mg de protéine).

IV.1.4. Etude *in vivo* : Test de micronoyaux

IV .1.4.1. Effet des extraits sur le taux de micronoyaux

Le test des MN consiste à dénombrer des entités formées par cassures ou dommages chromosomiques, après l'exposition des cellules à un agent génotoxique, lors de la division cellulaire. Les MN sont morphologiquement plus petites que les noyaux de la cellule (Pham, 2011).

Les résultats de dénombrement des micronoyaux dans les différents lots de l'expérimentation sont représentés dans la figure 20 exprimés en pourcentage % (figure 19).

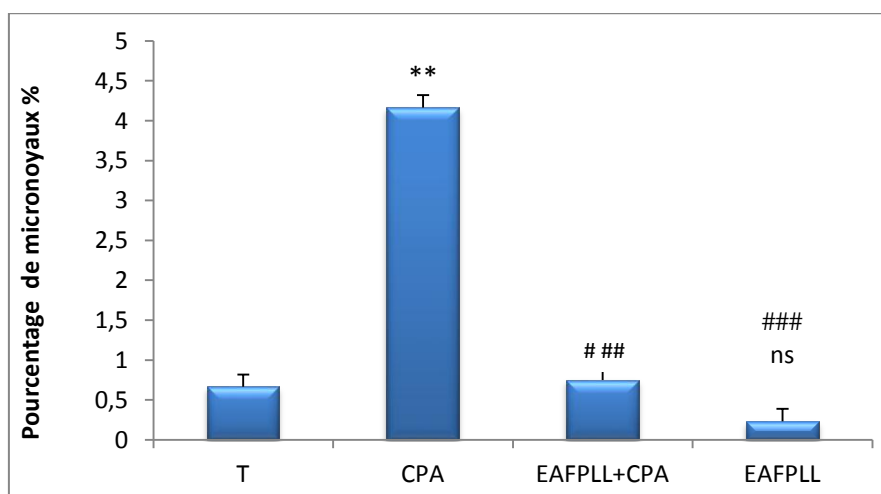


Figure 19 : variation du pourcentage des micronoyaux des érythrocytes

T : témoin négatif, CPA : groupe traité par le cyclophosphamide, EACPA : groupe prétraité par l'extrait aqueux et le cyclophosphamide, EA : extrait aqueux des feuilles de PLL.

Test de Student : (*) désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (**) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (***) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec le témoin négatif, (#) : désigne un effet significatif ($p < 0,05$), (##) désigne un effet hautement significatif ($p < 0,01$), (###) désigne un effet très hautement significatif ($p < 0,001$) en comparaison avec le cyclophosphamide seul, ns : désigne un effet non significatif ($p > 0,05$).

D'après ces résultats, nous avons remarqué une augmentation hautement significative ($p < 0,01$) des pourcentages des micronoyaux chez les souris traitées par le cyclophosphamide (4.16%) par rapport au témoin négatif (0.66%) et une augmentation non significative ($P < 0,05$) chez les souris prétraitées par extrait aqueux en association avec le cyclophosphamide (0.75%) et une diminution non significative ($P < 0,05$) chez les souris traitées par l'extrait aqueux seul (0.23%) par rapport au témoin négatif.

Alors que le pourcentage des micronoyaux est diminué de façon très hautement significative ($P < 0,001$) chez les souris prétraitées par extrait aqueux en association avec le cyclophosphamide (0.75%) et les souris traitées par l'extrait aqueux seul (0.23%) par rapport aux souris traitées par le cyclophosphamide seul.

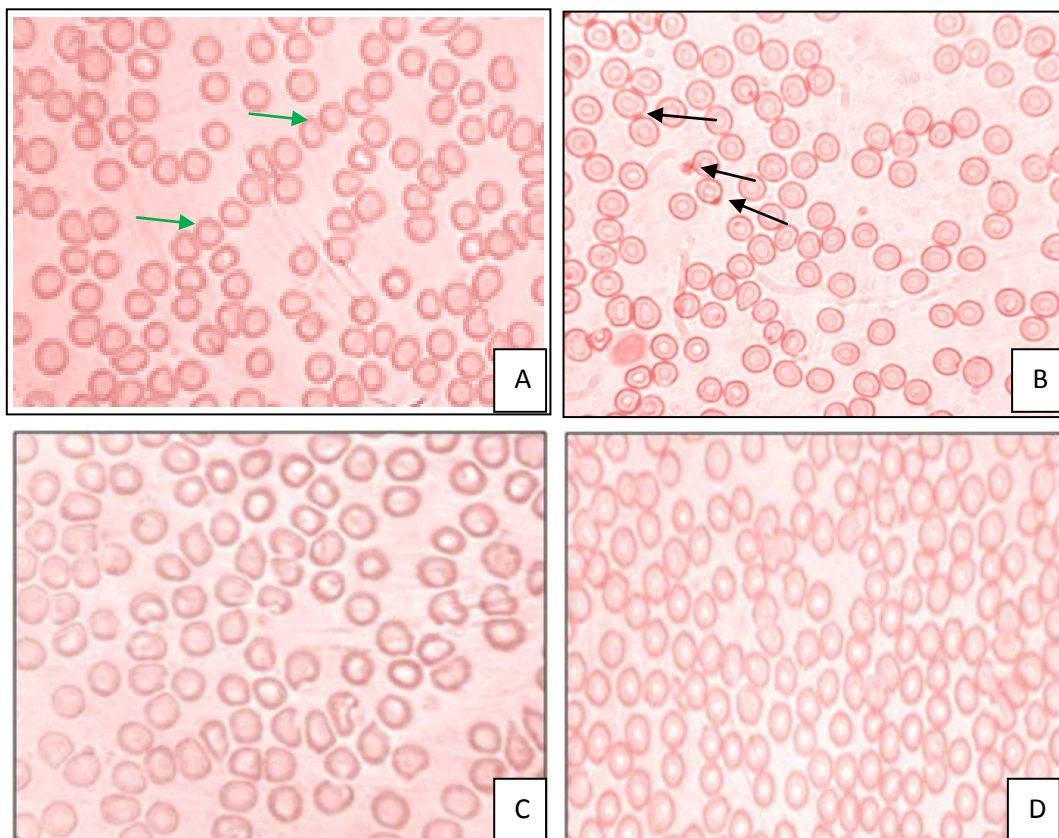


Figure 20 : microphotographie montrant certains frottis réalisés pour le test de micronoyaux des souris témoin négatif (A), témoin positif (B), traité par cyclophosphamide (C), prétraité par extrait aqueux de PLL et CPA (D), après une coloration MGG (GR : $\times 100$).

- Erythrocytes micronucléés.
- Erythrocytes sans micronoyaux.

V.2. Discussion

Le cyclophosphamide est un médicament cytostatique qui agit de manière non spécifique à la fois sur les cellules tumorales et sur les cellules saines normales avec une forte capacité de prolifération en se liant à l'ADN et en interférant avec le cycle cellulaire (Gamal-Eldeen *et al.*, 2013).

L'objectif de notre étude est d'une part de réaliser l'extraction aqueuse et éthanolique à partir de feuilles de *P. lentiscus L.* pour faire une étude phytochimique par le dosage des composés phénoliques et d'étudier *in vitro* l'activité anti oxydante des deux extraits et d'autre part d'étudier l'effet génotecteur *in vivo* de l'extrait aqueux sur des souris traitées par le cyclophosphamide par la réalisation de test de micronoyaux.

L'extraction des composés phénoliques à partir du matériel végétal est une étape cruciale pour la valorisation de ces substances bioactives. Les extraits utilisés dans cette expérimentation sont obtenus après une macération de la poudre fine de feuilles de PLL dans l'éthanol et dans l'eau permettant d'extraire les molécules hydrophiles et lipophiles. On remarque d'après les résultats obtenus dans cette étude que le rendement d'extraction de feuilles de PLL était de 44.88% et 25.7% pour l'extrait secs aqueux et éthanolique respectivement. Nos résultats sont très proches de ceux trouvés par Cherbal et ses collaborateurs., (2012) où le rendement d'extraction est de 44.58 % mais ils sont supérieurs à celui trouvés par Remila *et al.*, (2015) où le rendement d'extraction ne dépasse pas 6.09%.

Le type du solvant utilisé est l'un des facteurs qui influence le rendement d'extraction et même la qualité de l'extrait, autrement dit, avec la pureté des principes actifs (Tabart *et al.*, 2007). D'autres facteurs qui peuvent influencer la variabilité du rendement d'extraction sont : l'origine géographique de la plante (climat et sol), la saison de la récolte et la durée et les conditions de stockage, la structure chimique, la taille des particules formant l'échantillon, le temps, les conditions de stockage ainsi que la présence d'interférants (Nacz et Shahidi, 2004).

Les composés phénoliques (acides phénoliques, tannins et flavonoïdes) sont les éléments phytochimiques qui présentent les effets pharmacologiques les plus importants des plantes. Pour cela, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes des tanins des 2 extraits étudiés de PLL a été effectué.

Les résultats de l'analyse phytochimique de la teneur en polyphénols, flavonoïdes et tanins effectuée sur l'extrait aqueux et éthanolique des feuilles de PLL ont montré des différentes quantités des composés phénoliques selon le type du solvant. Les résultats ont révélé que l'eau était un meilleur solvant comparé à l'éthanol pour extraire les flavonoïdes et les tanins par contre l'éthanol est idéal pour l'extraction des polyphénols.

Les résultats de notre étude montrent que l'extrait aqueux et éthanolique de PLL possèdent des teneurs de 114.70 ± 0.14 mgEAG/Gms et 146.53 ± 0.56 mgEAG/gMS respectivement en polyphénols. La richesse de l'extrait de PLL en polyphénols est confirmée par des études réalisés par Iratni (2016). Ce dernier a trouvé une teneur de $119,77 \pm 3,2$ mg EAG/g de MS en polyphénols dans l'extrait aqueux de PLL..Atmani et *al.*, (2009) ont confirmé que les feuilles de PLL sont plus riches en phénols totaux avec une valeur de 136.25 ± 18.9 mg /g.

La teneur en flavonoïdes des extraits, éthanoliques et aqueux des feuilles PLL ont été observées avec des valeurs de 22.90 ± 0.66 et 45.70 ± 0.72 mgEQ/g MS respectivement.

L'étude réalisée par Yemmen et ses collaborateurs ,(2017) a montré des valeurs inférieures à celui rapporté dans notre étude (10,26 et 7,31 mg EQ/g Ms) des extraits éthanoliques et aqueux respectivement des feuilles PLL.

Une autre étude réalisée par Iratni Ghenima, (2016) montre que l'extrait aqueux de feuilles de PLL est caractérisé par une teneur en polyphénols totaux de $119,77 \pm 3,2$ mg EAG/g MS. Les deux principales classes de polyphénols à savoir les flavonoïdes et les tanins totaux sont représentés par une teneur de $60,56 \pm 8,01$ mg équivalent gramme de quercitine /g de matière sèche végétale et de $25,57 \pm 5,03$ mg équivalent gramme d'acide tannique/g de matière sèche végétale.

La comparaison de la teneur en composés phénoliques obtenue dans notre étude avec celles rapportées par la littérature s'avère difficile. Cette difficulté est liée aux différentes conditions d'extraction notamment la température, le temps et le ratio entre le volume d'eau et la masse de matière végétale ainsi que de la nature de la plante utilisée pour l'extraction (Iratni , 2016).

Dans le présent travail, l'étude de l'effet du cyclophosphamide sur les défenses antioxydantes enzymatiques est faite par l'évaluation de l'activité du superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT) au niveau des mitochondries. Nos résultats montrent que le traitement par le cyclophosphamide a provoqué une diminution de l'activité enzymatique de la SOD et la CAT mitochondriales. Ces résultats observés sont similaires à ceux trouvés par Tripathi et Jena(2009) et par Bhattacharjee et ses collaborateurs, (2014). Cette diminution de l'activité enzymatique de la SOD et la CAT est peut être due à l'inhibition de la synthèse enzymatique par le CPA ou son métabolite et / ou à l'effet indirect du peroxyde d'hydrogène (Tripathi et Jena, 2009).

Le traitement des mitochondries par les deux extraits de feuilles de PLL éthanoliques et aqueux en association avec le cyclophosphamide a montré une augmentation de l'activité enzymatique de la SOD et catalase mitochondriale. Une amélioration de l'activité de ces deux enzymes par l'extrait aqueux de PLL est également rapportée par de nombreuses études (Chekchaki et *al.*, 2017; Zahouani et *al.*, 2020).

Le potentiel antioxydant des deux extraits de feuilles est également étudié dans la présente étude par deux tests: piégeage du radical hydroxyle et réduction du peroxyde d'hydrogène.

Les résultats observés montrent que le pouvoir de piégeage des radicaux hydroxyles (OH^\bullet) et du peroxyde d'hydrogène des deux extraits est très proche de celui de l'acide ascorbique, l'acide gallique ou la quercétine qui sont considérés comme des antioxydants de références. Plusieurs études ont rapporté l'activité antioxydante des deux extraits de feuilles de PLL utilisant plusieurs tests *in vitro* (Benhammou et *al.*, 2008 ; Ghenima et *al.*, 2015 ; Pelanken et Taiwe, 2017 ; Boucheffa et *al.*, 2021).

En vue de ces résultats on constate que les deux extraits des feuilles de PLL ont prouvé une meilleure activité antioxydante ; probablement due à la richesse de ces extraits en composés phénoliques (Bhatti et *al.*, 2015). Plusieurs études indiquent la présence d'une corrélation positive entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques et leurs structures (Luximon-Ramma et *al.*, 2002 ; Lamien-Meda et *al.*, 2008) Généralement, les polyphénols avec un nombre élevé de groupements hydroxyles présentent l'activité anti radicalaire la plus élevée (Heim et *al.*, 2002), due à leur pouvoir de donner plus d'atomes d'hydrogènes pour stabiliser les radicaux libres (Torres de pinedo et *al.*, 2007).

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que le traitement des souris par le cyclophosphamide à une dose unique de 40 mg/kg de poids corporel pendant 24h a provoqué

une augmentation significative du pourcentage des erythrocytes micronucléés dans le sang périphérique ce qui confirme son potentiel clastogène.

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Basua et *al.*, (2015) qui ont trouvé que l'injection du CPA par voie intrapéritonéale à la dose de 25 mg/kg a induit une augmentation du pourcentage des micronoyaux par rapport au groupe témoin. Rehman et ses collaborateurs, (2012) ont confirmé également la génotoxicité provoquée par le cyclophosphamide après administration d'une injection unique de médicament par voie intrapéritonéale (ip) à la dose de 50 mg/kg de poids corporel chez la souris albinos suisses.

Selon Bhattacharjee et ses collaborateurs, (2014), l'effet génotoxique du cyclophosphamide est peut être due à l'activation par les enzymes hépatiques du cytochrome P450 pour produire des métabolites réactifs tels que le 4-hydroxy-CP, l'acroléine et la moutarde phosphoramide. Ces métabolites peuvent alkyler les sites nucléophiles de l'ADN, ce qui provoquent une génotoxicité et des effets mutagènes.

Le traitement préventif des souris par l'extrait aqueux de feuille de *Pistacia lentiscus L* pendant 10 jours a une dose de 100 mg/ Kg du poids corporel a montré une réduction significative de la formation de micronoyaux dans les érythrocytes du sang périphérique, ce qui confirme l'effet bénéfique de l'extrait de feuille de *Pistacia lentiscus L* dans la réduction des dommages à l'ADN.

Plusieurs études ont rapporté l'effet génotecteur des extraits de plantes (Amado et *al.*, 2020, Braham et *al.*, Oliveira *al.*, 2020). D'après les résultats trouvés par ces études, l'effet antigénotoxique de l'extrait aqueux de feuille de *Pistacia lentiscus* observé dans ce travail peut être corrélé à sa richesse en composés phénoliques et ses propriétés antioxydantes, de manière similaire à de nombreux extraits végétaux. Cet effet peut résulter d'un effet direct sur les ROS intracellulaires ou de l'activation de mécanismes de défense antioxydants cellulaires (Oliveira *al.*, 2020).

Conclusion

Le cyclophosphamide (CPA) est un médicament largement utilisé pour le traitement de divers types de cancers. Malgré l'efficacité marquée du cyclophosphamide, son application clinique est limitée en raison de ses effets indésirables tels que la neurotoxicité, l'hépatotoxicité, la néphrotoxicité et la génotoxicité.

La présente étude a pour objectif d'évaluer l'effet protecteur de l'extrait des feuilles de PLL de la région de Jijel contre la génotoxicité induites par le cyclophosphamide.

Les procédés d'extraction utilisés dans cette étude nous ont permis de retenir un extrait aqueux et un extrait éthanolique des feuilles de PLL. Le dosage des différents composés phénoliques montre que l'extrait aqueux contient la teneur la plus élevée en flavonoïdes et tanins par rapport à l'extrait éthanolique qui contient la teneur la plus élevée en polyphénols.

Les résultats trouvés dans cette étude montrent que la stimulation des mitochondries par le cyclophosphamide a induit une perturbation dans le système antioxydant enzymatique qui se traduit par une diminution de l'activité enzymatique de la SOD et la CAT mitochondriales.

En effet, l'activité de ces enzymes (SOD et CAT) est améliorée par le traitement des mitochondries par les deux extraits aqueux et éthanolique de PLL. L'activité antioxydante de ces deux extraits est confirmée dans cette étude par une augmentation remarquable du pouvoir de piégeage des radicaux hydroxyles (OH°) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par les extraits de PLL.

Les résultats obtenus dans la deuxième partie *in vivo* ont montré que le cyclophosphamide utilisé à la dose 40mg/kg par voie I.P a provoqué des dommages considérables à l'ADN qui sont détectés par une augmentation des pourcentages des micronoyaux dans les cellules du sang périphérique. Cependant, le traitement préventif par l'extrait aqueux de feuille de PLL pendant 10 jours présente un intérêt réel par son effet protecteur contre la génotoxicité du cyclophosphamide.

Pris ensemble, ces résultats ont révélé que les deux extraits aqueux et éthanolique de PLL semblent être une stratégie attrayante pour minimiser les effets secondaires induits par le cyclophosphamide notamment le stress oxydatif et la génotoxicité grâce à sa richesse en composés phénoliques bioactifs.

Ces travaux ouvrent un certain nombre de perspectives et appellent un prolongement de certaines études afin de pouvoir approfondir la compréhension des mécanismes impliqués dans les effets bénéfiques des extraits de feuilles de PLL. Des études supplémentaires, notamment à long terme; sont nécessaires pour confirmer ce potentiel extrêmement intéressant des deux extraits et déterminer le ou les mécanisme (s) qui régissent l'effet préventif relevé dans notre étude.

Alvarenga, F. C. R. Synthèse de nouveaux analogues de nucléosides potentiellement antiviraux . Université Grenoble Alpes. (2016). P : 66.

Abdel wahed A. Bouhlel I. Skamdrani I. Valenti K. Kadri M. Guirand P. Steiman R. Mariotte A. M. Gherdia K. Laporte F. Dijoux F. Ranca MG. Chekir Ghedira L. Study of antimutagenic and antioxidant activities 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from Pistacia Lentiscus confirmation by microarray expression profiling. *Chem. Biol. Inter*, (2007), vol 165, p:1-13.

Ahlmann M. Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, (2016), vol 78, 661-671.

Ahmadi A. Hosseinimehr S.J. Naghshvar F. Hajir E. Ghahremani M. Chemoprotective effects of hesperidin against genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice bone marrow cells. *Arch Pharm Res*, (2008), vol31, p: 794-997.

Al Habbal Jamil M. Al Habbal Z. Umer Huwez F. A Double- Blind Controlled Clinical Trial of Mastic and Placebo in the Treatment of Duodenal Ulcer. *Clinical and experimental pharmacology and physiology*, (1984), Vol 11, p:541-544.

Amado P. A. Castro A. H. F. Zanuncio V. S. S. Stein V. C. da Silva D. B. Dos Santos Lima L. A. R. Assessment of allelopathic, cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of Smilax brasiliensis Sprengel leaves. *Ecotoxicology and environmental safety*, (2020), vol 192. P32.

Amri-Tiliouine W. Induction de la variabilité génétique par radio-mutagnèse (rayons gamma) chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.) et évaluation agronomique et génétique (Low-Cost TILLING) de mutants en M₂. *Ecole nationale supérieure agronomique EL-Harrach- Alger*, (2019), p : 22-23.

Atmani D. Chaher N. Berboucha M. Ayouni K. Lounis H. Boudaoud H. Debbache N. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food CChem*, (2002), vol 112, p : 303–309.

Attia SM. Molecular cytogenetic evaluation of the aneugenic effects of teniposide in somatic and germinal cells of male mice. *Mutagenesis*, (2011), vol. 27, p : 31-39.

Ayza M. A. Zewdie K. A. Tesfaye B. A. Wondafrash D. Z. Berhe A. H. The role of antioxidants in ameliorating cyclophosphamide-induced cardiotoxicity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, (2020), vol 20.

Baba-Aissa F. Encyclopédie des plantes utiles. *Flore d'Algérie et du Maghreb*, (1999), p:1-218.

Bammou M. Daoudi A. Slimani I. Najem M. Bouiamrine E. H. Ibjibjen J. Nassiri L. Valorisation du lentisque *Pistacia lentiscus L.* Étude ethnobotanique Screening phytochimique et pouvoir antibactérien. *Journal of applied biosciences*, (2015), vol 86, p : 79, 66, 79, 75.

Barazani O. Dudai N. Golan-Goldhirsh A. Comparison Of Mediterranean *Pistacia Lentiscus* Genotypes By Random Amplified Polymorphic Dna, Chemical, And Morphological Analyses. *Journal Of Chemical Ecology*, (2003), vol 29, p8 .

Basu A. Ghosh P. Bhattacharjee A. Patra A.R. Bhattacharya S. Prevention of myelosuppression and genotoxicity induced by cis platin in murine bone marrow cells: effect of an organo vanadium compound vanadium (III)-L-cysteine. *Mutagenesis*, (2015), vol 30, p :509-517.

Belfadel F.Z. Huile de fruits de *Pistacia lentiscus*-Caractéristiques physicochimiques et effets biologiques. (2009) .Université Constantine 1. p : 139.

Belfayol L. Guillevin L. Louchahi K. Lartholary O. Bosio A.M. et Fauvelle F. Measurement of 4-hydroxycyclophosphamide in serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal ofChromatography* , (1995), vol 663, p : 395-399.

Belhachat D. Etude phytochimique des extraits de *Pistacia lentiscus L* Activité antioxydante, antimicrobienne et insecticide. (2019). Ecole Nationale Supérieure Agronomique- El-Harrach-Alger. P : 81.

Belli N. Mesbah L. Chebab S. Tekouk M. Leghouchi E. Stress oxydant induit par la coexposition

Bellon S. Lésions pontées radio-induites de l'ADN: synthèse, mesure et incorporation dans des oligonucléotides pour l'étude de leur réplication et de leur réparation.(2003). Université Joseph Fourier (Grenoble). P : 17.

Benhacine L. Sahil N. Etude de la génotoxicité des extraits de Pistacia lentiscus par le test d'Ames. (2016) . Université A. MIRA – Bejaia. P : 46.

Benhammou N. Atik Bekkara F. et Panovska T.K. Antioxidant and antimicrobial activities of the Pistacia lentiscus and Pistacia atlantica extracts. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* , (2008),vol 2 p: 22-28.

Berthelot-Ricou A. Perrin J. Orsière T. Aye M. Roustan A. Botta A. Courbiere B. Risque génotoxique et ovocytes: principes de toxicologie génétique et applications. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, (2013), vol 41, p : 544-547.

Bettaieb A. Mécanismes d'induction de l'apoptose par le choc thermique et effet protecteur de la thermotolérance induite à 40°C. (2009). Université du Québec à Montréal . P: 58.

Bhattacharjee A. Basu A. Ghosh, P. Biswas J. Bhattacharya S. Protective effect of Selenium nanoparticle against cyclophosphamide induced hepatotoxicity and genotoxicity in Swiss albino mice. *Journal of biomaterials applications*, (2014), vol 29, p: 303-317.

Bhatti M. Z. Ali A. Ahmad A. Saeed A. et Malik S. A. Antioxidant and phytochemical analysis of Ranunculus arvensis L extracts. *BMC Research Notes*, (2015), vol 8, p : 6-8.

Bhourri W. Derbel S. Skandrani I. Boubaker J. Bouhlef I.B. Sghaier M. Kilani S. Mariotte A. M. Dijoux-Franca M. G. Ghedira K. and Chekir-Ghedira L. Study of genotoxic, antigenotoxic and antioxidant activities of the digallic acid isolated from Pistacia lentiscus fruits. *Toxicology in Vitro*, (2010), vol 24 p: 509–515.

Boddy A. V. Yule S. M. Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines. *Clinical pharmacokinetics*, (2000), vol 38(4), p 291-304.

Boubekri C. Etude de l'activité antioxydant des polyphénols extraits de Solanum melongena. (2014).Université Mohamed Khider – Biskra.

Bouhrara M. Caractérisation physicochimique et biochimique d'un extrait de Pistacia Lentiscus et détermination de ses effets sur certains paramètres biologiques. (2014). university oum el bouaghi. P:20

Boullard B. Dictionnaire des plantes médicinales du monde: Réalités et Croyance, Ed Estem. (2001). p : 414, 415.

Boumeras A. Naga A. Evaluation de l'activité biologique de Pistacia lentiscus. L.in vitro. (2018). University Oum El Bouaghi. P: 47.

Boutemine I.M. Amri M. Amir Z.C. Fitting C. Mecherara-Idjeri S. Layaida K. Touil-Boukoffa C. Gastro-protective therapeutic and anti-inflammatory activities of Pistacia lentiscus L. fatty oil against éthanol-induced gastric ulcers in rats. *Journal of ethnopharmacology*, (2018), vol 224, p: 273-282.

Bozin B. Mimica-Dukic N. Samojlik I. Goran A. Igie R. Bozorgi M. Memarian I.Z. Mobli M. Hossein M. Surmaghi S. Shams-Ardekani M.R. Rahimi R. Phenolics as antioxidants in Five Pistacia species (P. vera, P. atlantica, P. terebinthus, P. khinjuk, and P. lentiscus) . *The Scientific World Journal* ,(2013), vol 2, p: 1-33.

Bradford L.P. Biography of an institution. *The Journal of Applied Behavioral Science*, (1967), vol 3, p: 127-143.

C., Hemma, R., Belhadj, S., Ouahchia & Saidi, F. antioxidant activity of Pistacia lentiscus methanolic extracts. *Revue agrobiologia*, (2018), vol 8, p: 845-852.

CastolaV. Bighelli A. Casanova J. Intraspeci"c chemical variability of the essential oil of *Pistacia lentiscus* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, (2000),vol 28 p: 79 88.

Cavallasca J.A. Costa C.A. del Rosario Maliandi M. Contini L.E. de Carrera E.F. Musuruana J. L. Severe infections in patients with autoimmune diseases treated with cyclophosphamide. *Reumatología Clínica* ,(2015), vol 11(4), p: 221-223.

Charef M. Yousfi M. Saidi M and Stocker P. Determination of the Fatty Acid Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* . *J Am Oil Chem Soc*, (2008), vol 85,p: 921–924.

Chekchaki N. Khaldi T. Rouibah Z. Rouag M. Sekiou O. Messarah M. Boumendjel A. Anti-inflammatory and antioxidant effects of two extracts from *Pistacia lentiscus* in liver and erythrocytes, in an experimental model of asthma. *methods*, (2017), vol. 18, p: 19.

Cheraft N. Activité biologique in vitro des extraits de *Pistacia lentiscus* contre les radicaux ABTS•+, O₂• et• NO et caractérisation des fractions actives . (2011). Université de Béjaia- Abderrahmane Mira. P :60.

Chevolleau S. Mallet J. F. Ucciani E. Gamisans J. Gruber M. Antioxidant activity in leaves of some mediterranean plants. *the American Oil Chemists Society* , (1992), vol 69, p: 1269–1271.

Claiborne A. Catalase activity In CRC hand book of methods for oxygen radical research, Composition of Acorn (*Quercus*), *Pistacia lentiscus* Seeds Growing in Algeria. *J Am Oil Chem Soc*, vol 85, p :921–924

Cotelle S. Etude de la génotoxicité de matrices complexes à l'aide de plantes supérieures. (1999). Université Paul Verlaine-Metz. P : 45.

Dahmoune F. Spigno G. Moussi K. Remini H. Cherbal A. and Madani K. *Pistacia lentiscus* leaves as a source of phenolic compounds: Microwave-assisted extraction optimized and compared with ultrasound-assisted and conventional solvent extraction.. *J. Industrial Crops and Products*. (2014),Vol. 61, p: 31-40.

Darne C. Guichard Y. Seidel C. Gaté L. Tests de génotoxicité : identifier des biomarqueurs d'effet lors des expositions a des agents cancérigène. *Références en santé au travail* , (2021) :p124.

De Jonge ME. Huitema DR. Rodenhuis A. Beijnen SJ. Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clin. pharmaco. kinet*, (2005); 44 (11): 1135-1164.

Dhifi1 W. Jelali N. Chaabani1 E. Beji1 M. Fatnassi S. Omri S. Mnifi1 W. Chemical composition of Lentisk (*Pistacia lentiscus* L.) seed oil. ,(2013), Vol. 8(16), p: 1395-1400.

Dimassi S. Tilla M. Sanlaville D. Anomalies chromosomiques. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, (2017), vol 30, p : 249-270.

Djedaia,M.S. Etude physico-chimique et caractérisation du fruit de la plante lentisque (*Pistacia Lentiscus* L.). (2017). université badji mokhtar-annaba.

DOB T., Dahmane D., Chelghoum C. (2006). chemical composition of the essential oils of *pistacia lentiscus* l. from algeria. *journal of essential oil research*. 17, 642-644.

Duan W. Hongbing W. Oxazaphosphorine bioactivation and detoxification the role of xenobiotic receptors. *Acta Pharmaceutica Sinica* , (2012).vol 2, p: 107-117.

Dündaröz R. ; Aydın H. I. ; Ulucan H. ; Baltacı V. ; Denli M. ; Gökçay E. Etude préliminaire sur les altérations de l'ADN chez les bébés non allaités. *Pediatr Int*, (2002), vol. 44, p : 127-30.

Elez Garofulić I. Kruk V. Martić A. Martić I. Zorić Z. Pedisić S. Dragović-Uzelac V. Evaluation of polyphenolic profile and antioxidant activity of *Pistacia lentiscus* L. leaves and fruit extract obtained by optimized microwave-assisted extraction. *Foods*, (2020), vol 9, p:15-56.

Emadi, A., Jones, R. J., & Brodsky, R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature reviews Clinical oncology*, (2009), vol 6, p: 638-647.

Fardel, O., Vernhet, L., Jung, A. V., Legrand-Lorans, A., & Nouvel, V. Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets. *Journée de restitution RECORD*, (2010), vol 10, p: 20.

Farouk R. Melek, Fawzia A. Aly, Iman A.A. Kassem*, Mona A.M. Abo-Zeid, Ayman A. Farghaly and Zeinab M. Hassan. Three further triterpenoid saponins from *Gleditsia caspica* fruits and protective effect of the total saponin fraction on cyclophosphamide-induced genotoxicity in mice. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2015, vol. 70, p : 31-37.

Fenech, M., Crott, J., Turner, J., Brown, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, (1999), Vol 14. p: 605-612.

Gamal-Eldeen, A.M., Abo-Zeid, M.A., Ahmed, E.F. Anti-genotoxic effect of the *Sargassum dentifolium* extracts: prevention of chromosomal aberrations, micronuclei, and DNA fragmentation. *Experimental and toxicologic pathology*, (2013), vol 65, p : 27–34.

Garcia S.T., Mcquillan A., et Panasci L. Correlation between the cytotoxicity of nelphalan and crosslink as detected by the ethileukimia in two children following treatment with a cis-diammine-di-chloroplatinium-II-based regimen for osteosarcoma. *Med. Pediatr. Oncol*, (1992), vol 20, p: 71-74.

Gardeli C., Vassiliki P., Athanasios M., Kibouris M., Komaitis M. Essential Oil Composition of *Pistacia Lentiscus* L. And *Myrtus Communis* L.: Évaluation of Antioxidant Capacity of Methanolic Extracts. *Food chemistry*, (2008), Vol 107, p : 1120-1130.

Gervot, L., Rochat, B., Gautier, J.C., Bohnenstengel, F., Kroemer, H., de Berardinis, V., Martin, H., Beaune, P., and de Waziers, I. Human CYP2B6: expression, inducibility and catalytic activities. *Pharmacogenetics*, (1999), vol 9, p: 295-306.

Giraud, B., Hebert, G., Deroussent, A., Veal, G.J., Vassal, G., and Paci, A. Oxazaphosphorines: new therapeutic strategies for an old class of drugs. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, (2010), vol6, p : 919-938.

Godet, F. Performances des tests d'Ames et micronoyaux triton appliqués à l'étude de la génotoxicité d'effluents complexes et des interactions entre polluants. (1993). Université Paul Verlaine-Metz. p15-16

Gollapudi, B. B., & McFadden, L. G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation research. Mutation research letters*, (1995), vol. 347, p: 97-99.

Goujon, E. Etude de la toxicité de la sulcotrione et de ses produits de photodégradation. (2015). Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II. P :50.

Graillet, V. Appréciation quantitative de l'exposition alimentaire à des mélanges de pesticides et mécanismes de génotoxicité. (2012).Université Toulouse III-Paul Sabatier. P: 37.

Hamia C., Guergab A., Rennane N., Birache M., Haddad M., Saidi M et yousfi M. Influence des solvants sur le contenu en composés phénoliques et l'activité antioxydante des extraits du rhanterium adpressium. *Annales des Sciences et Technologie*, (2014), vol 47, p : 33-38.

Hans, W. K. 1000 plantes aromatiques et médicinales. *Terre édition*, (2007), p : 6-7.

Hayashi, M. The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. *Genes and Environment*, 2016, vol 38, p:1-6.

Heim E.K., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. Flavonoïds antioxydants: chemistry; metabolism and structure-activity relationships. *The journal of Nutritional Biochemistry*, (2002), vol 13: p: 572-584.

Iarmarcovai, G., Botta, A., & Orsière, T. Changes in chromosome number, genetic instability, and occupational exposures. *Bulletin du cancer*, (2007), vol. 94, p. 381-388.

Iqbal, A., Iqbal, M. K., Sharma, S., Ansari, M. A., Najmi, A. K., Ali, S. M., ... & Haque, S. E. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: old drug with a new vision. *Life sciences*, (2019), vol 218, p :112-131.

Iratni Ghenima A. activiti biologique, d'intérêt médicinale, d'extrait des feuilles de pistacia lentiscus et origanum majorana. (2016). Universite Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou. p41.

Janakat S, Al-Merie H. Evaluation of hepatoprotective effect of Pistacia lentiscus, Philly realatifolia and Nicotianaglauca. *Journal of Ethnopharmacology*, (2002), vol 83, p: 135-138.

Jean, J. M., & Hall, K. B. 2-Aminopurine fluorescence quenching and lifetimes: role of base stacking. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (2001), vol. 98, p: 37-41.

Johnson, D., & Lardy, H. Isolation of liver or kidney mitochondria. In : *Methods in enzymology*, (1967), p:94-96.

Julkunen-Tiitto, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of agricultural and food chemistry*, (1985), vol 33, p: 213-217.

Kaltenbach, S. Rôle des facteurs de la réparation de l'ADN dans la dynamique du génome au sein du système immunitaire. (2015). Université Sorbonne Paris Cité. P: 16.

Kamaraj, S., Ramakrishnan, G., Anandakumar, P., Jagan, S. and Devaki, T. Antioxidant and anticancer efficacy of hesperidin in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in mice, *Investigational New Drugs*, (2009), vol 27, p: 214–222.).

Kebsa, W. Etude des mécanismes de cytotoxicité et de réversion de la Multi Drug Résistance (MDR) à la doxorubicine par la propolis et l'acide gallique dans le cas du cancer de poumon *in vivo* et *in vitro*. (2018). Université de jijel.

Kim, D. O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y., & Lee, C. Y. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of agricultural and food chemistry*, (2003), vol 51, p: 6509-6515.

Kim, K. B. and Lee, B. M. Oxidative stress to DNA, protein, and antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) in rats treated with benzo(a)pyrene, *Cancer letters*, (1997), vol 113, p: 205–212.

Kim, Y. S., Gupta Vallur, P., Phaëton, R., Mythreye, K., & Hempel, N. Insights into the Dichotomous Regulation of SOD2 in Cancer. *Antioxidants*, (2017), vol 6, 86.

Kirsch-Volders, M., De Boeck, M., & Lison, D. Tests de génotoxicité." Encyclopedie Medico-Chirurgicale. Toxicologie-Pathologie Professionnelle , (2002), p : 1.

Kıvçak, B., & Akay, S. Quantitative determination of α -tocopherol in *Pistacia lentiscus*, *Pistacia lentiscus* var. *chia*, and *Pistacia terebinthus* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia*, (2005), vol 76, p:62-66.

Krishna, G., & Hayashi, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, (2000), vol 455, p: 155-166.

Krishna, G., Krishna, P. A., Goel, S., & Krishna, K. A. Alternative Animal Toxicity Testing and Biomarkers. Biomarkers in Toxicology, *TOXICITY TESTING MODELS AND BIOMARKERS*, (2019), p:143-161.

Kutlu, T., Takim, K., Çeken, B., & Kizil, M. DNA damage protecting activity and in vitro antioxidant potential of the methanol extract of Cherry (*Prunus avium* L). *Journal of medicinal plants research*, (2014), vol 8, p:715-726.

Lahsissene, H., Kahouadji, A., & Hseini, S. Catalogue des plantes médicinales utilisées dans la région de Zaër (Maroc Occidental). *Lejeunia, Revue de Botanique*. (2009).

Lamien-Meda A., Lamien C., Compaoré M., Meda R., Kiendrebeogo M., Zeba B., Nacoulma O. Polyphenol content and antioxidant activity of fourteen wild edible fruits from BurkinaFaso. *Molecules*, (2008), vol 13, p : 581-594.

Lemiere, S. Intérêts du test des comètes pour l'évaluation de la génotoxicité environnementale. Université Paul Verlaine. (2004).

Lenglet, G. Mécanisme d'action de nouveaux agents alkylants ciblant l'ADN ou les protéines. (2010). Université du Droit et de la Santé-Lille II. P :26-27.

Luximon-Ramma A., Bahorun T., Soobrattee M.A., Aruoma O.I. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2002), vol 50, p: 5042-5047.

Maameri-Habibatni, Z. *Pistacia lentiscus*. L.: Evaluation pharmacotoxicologique . Université Constantine 1, Algérie. (2014).

Magniez., Mr Magniez le test des comètes, 2010.

Mahmoud M. Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPAR γ and abrogation of oxidative stress and inflammation. (2014). Beni-Suef University. P: 63.

Mahmoudi S., Khali M., et Mahmoudi N. Etude de l'extraction des composés phénoliques de différentes parties de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.), *Revue Nature & Technologie. B- Sciences Agronomiques et Biologiques*, P. 35-40.

Marklund S et Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. of Biochem*, (1974), Vol 47,p: 469-474.

Mease, P. J. Tumour necrosis factor (TNF) in psoriatic arthritis: pathophysiology and treatment with TNF inhibitors. *Annals of the rheumatic diseases*, (2002), vol 61, p :298-304.

Merlin, F. Le hasard et les sources de la variation biologique: analyse critique d'une notion multiple. (2009).Université Panthéon-Sorbonne-Paris I. p : 127.

Messal Djelti A, N. Contribution au développement de la dosimétrie biologique en Algérie par les méthodes de cytogénétique. (2018) :p46-47-48).

Moghe, A., Ghare, S., Lamoreau, B., Mohammad, M., Barve, S., McClain, C., & Joshi-Barve, S. Molecular mechanisms of acrolein toxicity: relevance to human disease. *Toxicological Sciences*, (2015), vol 143, p:242-255.

Mukherjee ,R. Prevention of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and genotoxicity: effect of an L-cysteine based oxovanadium(IV) complex on oxidative stress and DNA damage. (2015). Jadavpur University. P:188.

Muluken Altaye Ayza , Kaleab Alemayehu Zewdie , Bekalu Amare Tesfaye , Dawit Zewdu Wondafrash , and Abera Hadgu Berhe. The Role of Antioxidants in Ameliorating Cyclophosphamide Induced Cardiotoxicity, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, vol. 2020.

Nacz M., Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, 2006. *J. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Vol. 41, p: 1523-1542.

Nafees, S., Ahmad, S. T., Arjumand, W., Rashid, S., Ali, N., & Sultana, S. Modulatory effects of gentisic acid against genotoxicity and hepatotoxicity induced by cyclophosphamide in Swiss albino mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (2012), vol 64, p : 259-267.

Nshimiyimana D S and He Q. Radical Scavenging Capacity of Rwandan CTC. *Nutrition*, (2010), vol 9, p: 589-593.

Oliveira, D., Latimer, C., Parpot, P., Gill, C. I., & Oliveira, R. Antioxidant and antigenotoxic activities of Ginkgo biloba L. leaf extract are retained after in vitro gastrointestinal digestive conditions. *European journal of nutrition*, (2020). vol 59, p : 465-476.

Orsière, T., Sari-Minodier, I., Decome, L., Botta, C., Iarmarcovai, G., & Botta, A. De la génotoxicologie à la biosurveillance. *Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP*, (2005), vol 28, p:25- 28.

Ortega Eslava M.I Tests de genotoxicite: Utilite en medecine du travail Difficultes lors de son application a la surveillance medicale des travailleurs. *Arch Public Health*, (2004), vol 62, p : 71-8.

Pannetier, P. Outils alternatifs à l'expérimentation animale pour l'évaluation de la toxicité des contaminants de l'environnement: lignées cellulaires et tests embryo-larvaires chez un poisson modèle le Médaka japonais, *Oryzias latipes*. (2018). Université de Bordeaux . p : 76.

par des techniques électrochimiques. (2014). université Mohamed khider, Biskra, p: 68.

Pham, T. C. V. Évaluation de la fréquence des micronoyaux et du potentiel clastogène et/ou aneugène du benzo-a-pyrène suite à une exposition in vitro des lymphocytes humains. (2011). Université de Montréal.

Pisoschi, A. M., & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress. *European journal of medicinal chemistry*, (2015), vol 97, p: 55-74.

Plumejeaud, S. Evaluation des potentiels génotoxiques de particules atmosphériques et de poussières de sols dans les observatoires Hommes-Milieux du bassin minier de Provence et d'Estarreja. (2016). Aix-Marseille. p :33.

Puig, M., Lugo, R., Gabasa, M., Giménez, A., Velásquez, A., Galgoczy, R., ... & Alcaraz, J. Matrix Stiffening And B1integrin Drive Subtype-Specific Fibroblast Accumulation In Lung Cancer. *Molecular, Cancer Research.*, (2015), vol (1), p: 161-173.

Qiu, R., Kalthorn, T. F., & Slattery, J. T. ABCC2-mediated biliary transport of 4-glutathionylcyclophosphamide and its contribution to elimination of 4-hydroxycyclophosphamide in rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, (2004), vol 308, p: 1204-1212.

Queiroz, Y. S., Ishimoto, E. Y., Bastos, D. H., Sampaio, G. R., & Torres, E. A. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: in vitro antioxidant activity. *Food chemistry*, (2008), vol. 111, p: 925-929.

Ravelomanantsoa, S. Biologie des populations du complexe d'espèces *Ralstonia solanacearum* appliquée à l'épidémiologie de la bactériose vasculaire de la pomme de terre à Madagascar. (2018). Université de la Réunion; Université d'Antananarivo. p :47.

Rehman MU, Tahir M, Ali F et al. Cyclophosphamide –induced nephrotoxicity and damage in kidney genomic DNA of swiss albino mice the protection effect of Ellagic acid. *Mol. and cell, Biochem*, (2012), vol 365, p: 199-127.

Remila S., Atmani-Kilani D., Delemasure S., Connat J.L., Azib L., Richard T. and Atmani D. Antioxidant, cytoprotective, anti-inflammatory and anticancer activities of *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae) leaf and fruit extracts. *Eur J Integr Med*, (2015).

Ricou-Berthelot A. Risque génotoxique et ovocytes. Etude sur modèle souris de la génotoxicité des cryoprotecteurs et des protocoles de vitrification ovocytaire. (2014). Université d'AixMarseille.

Rosenbloom, M., Leikin, J. B., Vogel, S. N., Chaudry, Z. A. Biological and Chemical Agents: A Brief Synopsis, *American Journal of Therapeutics*, (2002), vol 9, p: 5-14.)

Saidi, A. Effets des extraits de *Pistacia lentiscus* L. sur l'activité de l'élastase et sur le chimiotactisme des neutrophiles humains activés. (2012). Université Ferhat Abbas Setif. P :56.

Shet T, Agrawal A, Chinoy R, Havaladar R, Parmar V, Badwe R. «Changes in the tumor grade and biological markers in locally advanced breast cancer after chemotherapy--implications for a pathologist.» *Breast J*, (2007).Vol (5) p :457-64.

Shokrzadeh, M., Chabra, A., Ahmadi, A., Naghshvar, F., Habibi, E., Salehi, F., & Assadpour, S. Hepatoprotective effects of *Zataria multiflora* ethanolic extract on liver toxicity induced by cyclophosphamide in mice. *Drug res*, (2015), vol 65(4) p : 169-175.

Simon, L., & Carrell, D. T. Laboratory Evaluation of Sperm Chromatin Structure. *Encyclopedia of Reproduction*, (2018), Vol 5, p : 106-111.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, (1965). vol 16 p : 144-158.

Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., & Knez, , Ž. Phenols, Study of antimutagenic and antioxidant activities 1, 2, 3, 4, 6-pentagalloylglucose from *Pistacia Lentiscus* confirmation by microarray expression profiling. *Chem. Biol. Inter*, (2005). P : 165:1-13.

Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., & Knez, T. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*, (2005). vol 89, p : 191-198.

Smaga, I., Niedzielska, E., Gawlik, M., Moniczewski, A., Krzek, J., Przegaliński, E., J. Pera, J., & Filip, M. Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain. *Pharmacological Reports*, (2015), vol 167, p: 560-568.

Sommer, S., Buraczewska, I., & Kruszewski, M. Micronucleus assay: the state of art, and future directions. *International journal of molecular sciences*, (2020). vol 21p : 15-34.

Stankiewicz A, Skrzydlewska E. Protection Against cyclophosphamide-induced renal oxidative stress by Amifostine: *The Role of Antioxidative Mechanisms. Toxicol. Mech. Meth.* (2003), vol 13, p :301-308.

Tabart J., Kevers C., Sipel A., Pincemail J., Defraigne J.O. et Dommes J. Optimisation of extraction of phenolics and antioxidants from black currant leaves and buds and of stability during storage. *Food Chemistry*, (2007), vol 105, p : 1268–1275.

Torres De Pinedo A., Pen alver P., Morales J.C. Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: structure-activity relationship. *Food Chemistry*, (2007). vol 103 p: 55-61.

Touati, W. Sensibilisation de cellules tumorales au cyclophosphamide par transfert de gène: de l'in vitro à l'in vivo. (2013). *Thèse de doctorat*. Université René Descartes-Paris . p :50.

Tripathi DN, Jen GB. Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: A study in mice. *Chemico-Biological Interactions*, (2009). vol 180, p: 398–406

Undritz, E., Sandoz (Basel), & Darier, J. *Planches d'hématologie Sandoz*. Sandoz, (1972), p : 26-33.

Wang J. et Mazza, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumornecrosis factor α in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, (2002). vol 50, p: 4183-4189.

Whitwell J, Fowler P, Allars S, Jenner K, Lloyd M, Wood D, Smith K, Young J, Jeffrey L, Kirkland D. 5-Fluorouracil, colchicine, benzo[a]pyrene and cytosine arabinoside tested in the in vitro mammalian cell micronucleus test (MNvit) in Chinese hamster V79 cells at Covance Laboratories, Harrogate, UK in support of OECD draft Test Guideline 487. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, (2010). vol 702, p: 230-6.

Yemmen, M., Landolsi, A., Hamida, J. B., Mégraud, F., & Ayadi, M. TAntioxidant activities, anticancer activity and polyphenolics profile, of leaf, fruit and stem extracts of *Pistacia lentiscus* from Tunisia. *Cellular and molecular biology*, (2017). vol 63, p: 87-95.

Yilmaz, E., Melekoglu, R., Ciftci, O., Eraslan, S., Cetin, A., & Basak, N. The therapeutic effects of curcumin and capsaicin against cyclophosphamide side effects on the uterus in rats1. *Acta chirurgica brasileira*, (2018), vol 33, p: 499-507.

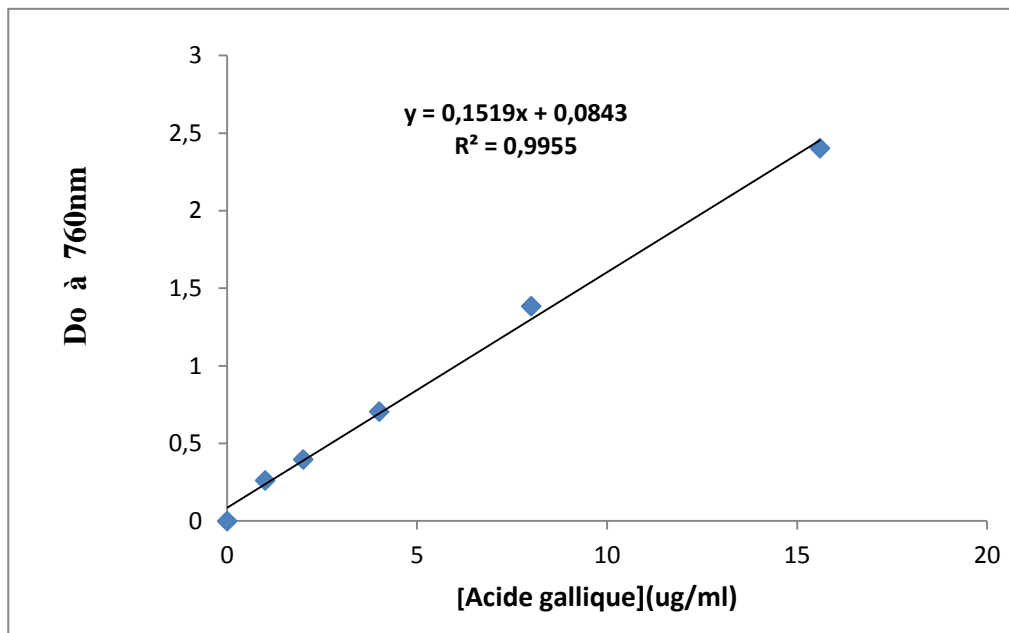
Zahouani, Y., Ben Rhouma, K., Kacem, K., Sebai, H., & Sakly, M. Aqueous leaf extract of *Pistacia lentiscus* improves acute acetic acid-induced colitis in rats by reducing inflammation and oxidative stress. *Journal of Medicinal Food*, (2021), vol 24, p: 697-708.

Zhang J., Tian Q., et Zhou S.Z. Clinical pharmacology of cyclophosphamide and ifosfamide. *Current Drug Therapy*, (2006) ,p : 55-84.

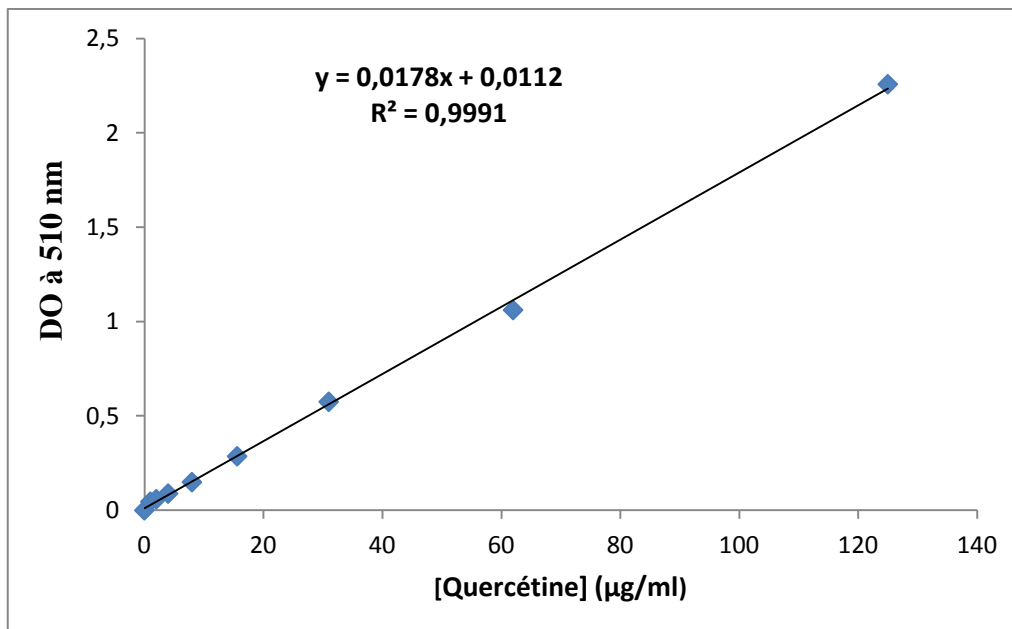
Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, (1999), vol. 64, p: 555-559.

Zhu, Y., & Bazemore-Walker, C. R. Mass spectrometry characterization of acrolein protein targets in the liver: *Focus on site-specific analysis*, (2013).

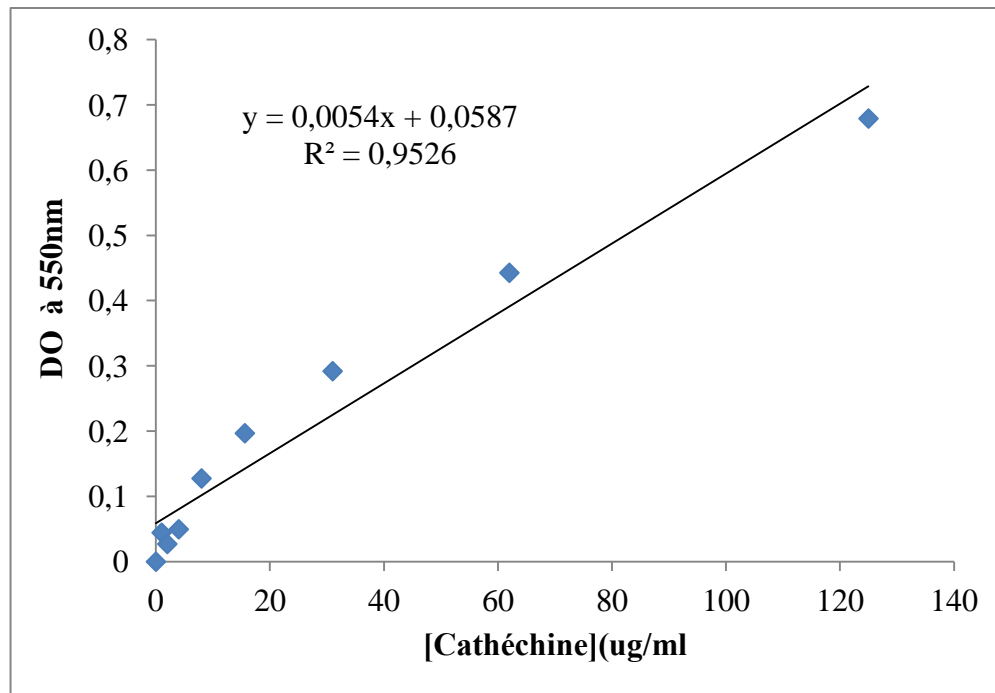
Annexe



Annexe1 : Courbe d'étalonnage du dosage des polyphénols en $\mu\text{g/ml}$ (Acide gallique utilisé comme standard).



Annexe 2. Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoïdes en $\mu\text{g/ml}$ (quercétine utilisée comme standard).



Annexe 3. Courbe d'étalonnage du dosage des tanins condensés en µg/ml (Cathéchine utilisée comme standard).



Annexe 4. Courbe d'étalonnage des protéines (BSA utilisée comme standard).

Effet antioxydant et génoprotecteur des extraits aqueux et éthanolique des feuilles de *Pistacia lentiscus L* de la région de Jijel

Résumé

Le cyclophosphamide (CPA) est un promédicament anticancéreux, largement utilisé dans la chimiothérapie qui appartient à la famille des moutardes azotées, responsable d'effets secondaires. La toxicité de ce médicament est caus e par des métabolites réactifs issus de sa biotransformation par les cytochromes P450 et/ou par la perturbation de la balance antioxydant/pro-oxydant. L'objectif principal de cette étude s'articule autour de l'évaluation d'une part, de l'effet antioxydant des extraits aqueux et éthanolique de feuille de PLL *in vitro* et d'autre part, l'effet protecteur de l'extrait aqueux de PLL *in vivo* sur des souris femelles NMRI, contre la génotoxicité induite par le cyclophosphamide (40mg/kg par voie I.P.). Notre expérimentation portant sur l'étude phytochimique des extraits aqueux et éthanolique de feuille de *Pistacia lentiscus L*. a révélé de fortes teneurs en composés phénoliques. L'analyse des paramètres de stress oxydatif mitochondrial après stimulation par le CPA a montré un déséquilibre des défenses antioxydantes se traduisant par une réduction des activités enzymatiques de la CAT et de la SOD. L'évaluation de la génotoxicité a montré une augmentation remarquable du pourcentage des cellules micronucl e es chez les animaux traités par le CPA. Cependant, le traitement par l'EAPLL a régulé les paramètres du stress oxydatif et a diminué le pourcentage des micronoyaux dans le sang périphérique.

Mots clés : CPA, génotoxicité stress oxydatif, *Pistacia lentiscus L*.

Abstract :

Cyclophosphamide (CPA) is an anticancer prodrug widely used in chemotherapy which belongs to the nitrogen mustard family, responsible of side effects. Its toxicity is caused by reactive metabolites resulting from its biotransformation by cytochromes P450 and / or by the disturbance of the antioxidant / pro-oxidant balance. The main objective of this study is to assess, on the one hand, the antioxidant effect of the aqueous and ethanolic leaf extracts of PLL *in vitro* and on the other hand, the protective effect of an aqueous extract of PLL leaves *in vivo* on female NMRI mice, against cyclophosphamide (40 mg / kg IP) induced genotoxicity. Our experiment on the phytochemical study of the aqueous and ethanolic extracts of the of *Pistacia lentiscus L*. revealed high levels of phenolic compounds. Analysis of mitochondrial oxidative stress parameters after stimulation with CPA showed an imbalance of antioxidant defenses resulting in a reduction in the enzymatic activities of CAT and SOD, and the genotoxicity study showed a remarkable increase in the rate of micronucleated erythrocytes in peripheral blood from CPA treated mice. However, treatment with EAPLL regulated the parameters of oxidative stress and decreased the percentage of micronuclei in peripheral blood red cells.

Key words: CPA, genotoxicity, oxidative stress, *Pistacia lentiscus L*

سيكلوفوسفاميد (CPA) هو دواء  ولي مضاد للسرطان يستخدم على نطاق واسع في العلاج الكيميائي الذي ينتمي   عائلة خردل النيتروجين ، وهو المسؤول عن الآثار الجانبية. تنجم سميت ه عن المستقلبات التفاعلية الناتجة عن تحوله  حيائي بواسطة السيتوكرومات P450 و /   بسبب اضطراب توازن مضادات  كسدة / المؤيدة لل كسدة. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم التآثير المضاد لل كسدة لمستخلصات  وراق المائية  ا ثانولية PLL في المختبر من ناحية ، ومن ناحية  خرى ، التآثير الوقائي للمستخلص المائي ل وراق PLL في الجسم الحي على فنران NMRI الالانثى ضد سيكلوفوسفاميد (40 ملغم / كغم IP) الناجم عن السمية الجينية. كشفت تجربتنا في دراسة الكيمياء النباتية للمستخلصات المائية  ا ثانولية لنبات *Pistacia lentiscus L*. عن مستويات عالية من المركبات الفينولية.  ظهر تحليل معاملات  جهاد التآكسدي للميتوكوندريا بعد التحفيز باستخدام CPA عدم توازن الدفاعات المضادة لل كسدة مما أدى  لى انخفاض في  نشطة  نزيمية لـ CAT و SOD ، و ظهرت دراسة السمية الجينية زيادة ملحوظة في نسبة النوى الدقيقة في كريات الدم الحمراء في الدم المحيطي عند الفنران المعالجة بـ CPA . ومع ذلك ، فإن العلاج باستخدام EAPLL ينظم معاملات  جهاد التآكسدي ويقلل من نسبة النوى الدقيقة في خلايا الدم الحمراء المحيطية.

الكلمات المفتاحية : *Pistacia lentiscus* ، السمية الجينية ،  جهاد التآكسدي ، CPA